

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

E.A.P DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

**Recuento de *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa
positivo en especies marinas de consumo en Lima
Metropolitana y Callao**

TESIS

para optar el título profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Talía Greta Amalia Dueñas Peña

ASESOR

Teresa Celina Gallardo Jugo

Lima – Perú

2008

Si logras conservar intacta tu firmeza
Cuando todos vacilan y tachan tu entereza;
Si a pesar de esas dudas mantienes tus creencias
Sin que te debiliten extrañas sugerencias;
Si puedes esperar, e inmune a la fatiga
Y fiel a la verdad, reacio a la mentira,
El odio de los otros te deja indiferente,
Sin creerte por ello muy sabio o muy valiente...

Si sueñas, sin por ello rendirte ante el ensueño,
Si piensas, mas de tu pensamiento sigues dueño;
Si triunfos o desastres no menguan tus ardores
Y por igual los tratas como dos impostores,
Si soportas oír tu verdad deformada,
Y cual trampa de necios por malvados usada,
O mirar hecho trizas de tu vida el ideal
Y con gastados útiles recomenzar igual...

Si toda la victoria conquistada
Te atreves a arriesgar en una audaz jugada,
Y aun perdiendo, sin quejas ni tristezas,
Con nuevos bríos reiniciar puedes tu empresa;
Si entregado a la lucha con nervio y corazón,
Aun desfallecido persistes en la acción
Y extraes energías, cansado y vacilante,
De heroica voluntad que te ordena, ¡adelante!...

Si hasta al pueblo te acercas sin perder tu virtud
Y con reyes alternas sin cambiar de actitud;
Si no logran turbarte ni amigo ni enemigo;
Pero en justa medida pueden contar contigo;
Si alcanzas a llenar el minuto sereno
Con sesenta segundos de un esfuerzo supremo,
Lo que existe en el mundo en tus manos tendrás
¡y además, hijo mío, un hombre tu serás!

– Rudyard Kipling (1835-1936)

A mis padres Nila y Elfry,
y mis hermanos Didier y Elfry,
por la dedicación y apoyo constante

Muchas gracias a todos los que,
de buena fe, tuvieron un buen consejo para mí
y a quienes recuerdo con cariño
con la palabra AMIGOS

Un agradecimiento a mi asesora, Q.F. Teresa Gallardo Jugo

Y a los miembros del Jurado examinador y calificador:

Dr. Fernando Quevedo Ganoza (Presidente)

Q.F. Ma. Elena Salazar Salvatierra,

Q.F. Carmen López Flores y

Q.F. Victoria Yrei Yamakawa.

La presente tesis forma parte del estudio de investigación “Aislamiento, Identificación y pruebas de Patogenicidad de *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, y otros Vibrios en Alimentos de Origen Marino” (Código 90407031) financiado por el Consejo Superior de Investigación de la UNMSM. RR N° 00661–CR–99 del 04.02.1999

ÍNDICE

Resumen – Palabras Clave

Summary – Key Words

Introducción

I	GENERALIDADES.....	13
1	La familia Vibrionaceae.....	13
2	El género <i>Vibrio</i>	13
3	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	15
4	La pandemia de los vibrios.....	16
4.1	Situación en el mundo.....	20
4.2	Situación sanitaria en el Perú.....	22
5	Grupos biológicos involucrados.....	26
II	PARTE EXPERIMENTAL.....	29
1	Parámetros microbiológicos y metodología.....	29
2	Equipos y materiales.....	29
3	Medios de cultivo y reactivos empleados.....	30
4	Procedimiento.....	33
4.1	Naturaleza y procedencia de las muestras.....	33
4.2	Recolección y manipulación de las muestras.....	33
4.3	Preparación de las muestras.....	33
4.3.1	Enriquecimiento.....	36
4.3.2	Crecimiento en TCBS.....	36
4.3.3	Purificación en GA y GS.....	37
4.4	Análisis bioquímicos preliminares.....	38
4.4.1	Pruebas generales.....	38
4.4.2	Pruebas específicas.....	39

4.4.2.1	Prueba de sensibilidad al vibriostático O/129.....	39
4.4.2.2	Prueba de la beta-galactosidasa.....	40
4.5	Pruebas bioquímicas complementarias.....	40
4.6	Prueba de Kanagawa.....	43
III	RESULTADOS.....	44
IV	DISCUSION.....	50
V	CONCLUSIONES.....	56
VI	RECOMENDACIONES.....	57
VII	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
VIII	INDICE DE FIGURAS	
1	Cronología de las pandemias de cólera.....	17
2	Variaciones de temperatura. El Niño 1997-1998.....	24
3	Pronóstico fenómeno El Niño.....	24
4	Mapa de descargas y plantas de tratamiento de aguas servidas.....	26
5	Recolección de muestras.....	35
6	Preparación de muestras.....	35
7	Preparación de muestra en homogenizador.....	36
8	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> en medio TCBS.....	37
9	Prueba de ureasa.....	43
IX	INDICE DE TABLAS	
1	Distribución de muestras según tipo y lugares de muestreo.....	44
2	NMP de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> Kanagawa positivo.....	45
3	Distribución de <i>V. parahaemolyticus</i> total y Kanagawa positivo.....	46
4	Detalle de NMP presente en cada muestra.....	46
5	Patogenicidad de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> total en agar Wagatsuma.....	47
6	Sinopsis de pruebas bioquímicas de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> total.....	48

X	ANEXOS.....	67
1	Lugares de origen de las muestras.....	68
2	Nombres científicos de especies analizadas.....	69
3	Medios de cultivo y reactivos.....	70
4	Categorías de riesgo.....	78
5	Determinación del número más probable.....	79
6	Asociación de <i>Vibrio</i> spp. con diferentes síntomas clínicos.....	80
7	Límites microbianos recomendados.....	81
8	Tablas detalladas de pruebas bioquímicas.....	82

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue hacer un recuento de *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa positivo a partir de 50 muestras de pescados, moluscos y crustáceos crudos procedentes de terminales pesqueros, muelles y supermercados de consumo en Lima Metropolitana y Callao entre noviembre de 1999 y abril de 2000. El análisis microbiológico se realizó de acuerdo a la metodología recomendada por el Manual Bacteriológico Analítico (BAM, 7 ed.). Se halló *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa positivo en 4 muestras aislándose 5 cepas con las características bioquímicas correspondientes de un total de 568 cepas sospechosas. Los valores hallados de Número Más Probable (NMP) fueron en pescados y crustáceos de 3/g cada uno y en moluscos un valor mínimo de 3/g y un máximo de 7,4/g. Las muestras que presentaron *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa positivo (n=4) representaron un 8% del total de especies marinas (n=50), siendo los porcentajes hallados en pescados 2% (n=1), moluscos 4% (n=2) y crustáceos 2% (n=1).

PALABRAS CLAVE: *Vibrio parahaemolyticus*, pescados, crustáceos, moluscos, Kanagawa positivo, NMP, Lima Metropolitana y Callao.

SUMMARY

The aim of this research was performing a count of *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa positive out of 50 samples including raw fish, mollusks and crustaceans collected from fishermen's wharf, fisheries, and supermarkets of edible character in Metropolitan Lima and Callao between november 1999 and april 2000. The microbiological analysis was performed according to Bacteriological Analytical Manual (BAM, 7 ed.). *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa positive was found in 4 samples from 5 strains with biochemical features that met those of *Vibrio parahaemolyticus* out of a total of 568 analized strains. The Most Probable Number (NMP) values found are as follows: Fish and crustaceans 3/g each, while molluscs had a minimum value of 3/g and a maximum of 7,4/g. *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa positive samples (n=4) represented 8% out of the total marine samples (n=50), being the percentages found in fish 2% (n=1), mollusks 4% (n=2) and crustaceans 2% (n=1) out of the total number of samples as well.

KEY WORDS: *Vibrio parahaemolyticus*, fish, mollusks, crustaceans, Kanagawa positive, MPN, Metropolitan Lima and Callao.

INTRODUCCIÓN

El género *Vibrio* comprende más de una decena de especies de las cuales *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* son asociadas principalmente con enfermedades gastrointestinales o no intestinales como septicemia, pudiendo la mayoría de las cuales ser transmitidas por los alimentos y ser causantes de intoxicaciones alimentarias como resultado del consumo de pescados, moluscos y crustáceos crudos o insuficientemente cocidos, o apropiadamente cocidos pero contaminados después de su cocción (Anexo 6).⁶⁹

Entre éstas especies, *Vibrio parahaemolyticus* (“que descompone la sangre”) es un microorganismo Gram–negativo de naturaleza mesófila y medianamente halófilo causante de infecciones gastrointestinales que se halla principalmente asociado con mariscos –moluscos y crustáceos– y pescados provenientes de aguas marinas contaminadas. Una vez infectado el individuo después de una incubación de 4 a 96 horas, se presentan una serie de síntomas tales como calambres abdominales, náuseas, vómitos y fiebre, los cuales son causados al adherirse el microorganismo al intestino delgado y excretar una enterotoxina. Menos comúnmente se presentan infecciones en heridas o en tejido blando. Generalmente, la enfermedad se resuelve en 3 días. Sin embargo, ha habido descripciones de formas clínicas más graves de la enfermedad que incluyen una disentería fulminante y características de una enfermedad coleriforme.^{16, 32, 41}

Vibrio parahaemolyticus ha sido considerado, tanto por su número como por los lugares de recolección, una causa de gastroenteritis de proporciones mundiales. Ha sido aislado de áreas marinas y estuarios casi mundialmente y, a pesar de su naturaleza halófila, aún ha podido ser hallado en aguas libres de sal. Sin embargo, las regiones en las que las enfermedades gastrointestinales son

endémicas constituyen un mayor peligro para la población que aquellas libres de dichos brotes, especialmente cuando los productos marinos provienen de las proximidades costeras en las que hay gran densidad poblacional.⁴³

Generalmente, cuando las temperaturas del agua son bajas, los peligros para la salud pública son menores que en épocas calurosas. Por ésta razón, los principales problemas microbiológicos asociados a pescados y mariscos son su aprovechamiento y la conservación de su calidad. No obstante, así como otros alimentos comercializados intensamente en todo el mundo, ellos comparten la posibilidad de actuar como vehículos de microorganismos patógenos y su peligrosidad guarda relación estrecha con las condiciones ambientales y con la naturaleza de los organismos involucrados.⁶²

En consecuencia, los moluscos, al ser animales sésiles que se alimentan filtrando el agua, pueden concentrar en ellos diversas bacterias y virus, y son potenciales vehículos de microorganismos peligrosamente patógenos. A su vez, crustáceos y peces también se hallan expuestos a estas bacterias patógenas para el hombre al ser el medio acuático su único medio de vida.¹⁵

En el Perú, un antecedente de estudio sobre la distribución de ese microorganismo lo hallamos en el análisis de cebiches de consumo en Lima realizado por Guevara *et al.* a finales de la década del 80, aislándose *V. parahaemolyticus* en el 27.03% del total de las muestras analizadas.³⁵

Al tener esta bacteria predilección por dichos ambientes acuáticos y al tener nuestra costa aguas marinas contaminadas, existe la posibilidad de contaminación de dichas especies marinas las cuales son consumidas diariamente por la población limeña siendo una de las causas desencadenantes de gastroenteritis por medio de la ingesta de alimentos crudos, mal cocidos o cocidos pero contaminados después de la cocción.

El objetivo del presente trabajo es el recuento de *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa positivo a partir de muestras de especies marinas tales como pescados, moluscos y crustáceos de consumo en Lima Metropolitana y Callao por medio del método del Número Más Probable (NMP).

I GENERALIDADES

1 La familia Vibrionaceae

En 1965, Verón se propuso crear la familia Vibrionaceae considerando agrupar aquellos géneros cuyas especies fueran oxidasa positiva y móviles por un flagelo polar. Actualmente, ésta familia se encuentra en la subsección V del manual de Bergey de bacteriología sistemática en el grupo de bacterias Gram-negativas facultativamente anaerobias correspondiente a la orden X Vibrionales. Dicha familia se encuentra constituida por bacilos, rectos o curvos, móviles por medio de flagelos polares que, en medios de cultivo sólidos, pueden sintetizar flagelos laterales adicionales. No forman endosporas ni microsporas y son quimioorganotróficos capaces de metabolismos respiratorio y fermentativo. No desnitrifican y la mayoría de las especies son positivas a la prueba de la oxidasa. Todas utilizan D-glucosa como única o principal fuente de carbono y energía; mientras que, la mayoría utiliza sales de amonio como únicas fuentes de nitrógeno; unas cuantas tienen requerimientos de factores orgánicos de crecimiento relativamente simples. La mayoría requiere 2–3% de NaCl o una base de agua de mar para un óptimo crecimiento. Dentro de los seis géneros considerados como parte de la familia *Vibrionaceae*, encontramos varias especies patógenas para el hombre, así como para otros vertebrados e invertebrados. Éstas son: *Allomonas*, *Enhydrobacter*, *Listonella*, *Photobacterium*, *Salinivibrio* y *Vibrio*.^{34, 60}

2 El género Vibrio

Hasta el año 2005, 75 especies son consideradas dentro del género *Vibrio*: *aerogenes* (Shieh *et al.* 2000, sp. nov.), *aestuarianus*, *agarivorans* (Macián

et al. 2001, sp. nov.), *albensis*, *alginolyticus*, *algynolyticus* Subs. *iophagus*,
anguillarum, *brasiliensis* (Thompson *et al.* 2003, sp. nov.), *calviensis*
(Denner *et al.* 2002, sp. nov.), *campbellii*, *carchariae*, *chagasii* (Thompson *et al.*
2003, sp. nov.), *cholerae*, *cincinnatiensis*, *corallilyticus* (Ben-Haim *et al.*
2003, sp. nov.), *costicola*, *crassostreae* (Faury *et al.* 2004, sp. nov.),
cyclitrophicus (corrig. Hedlund and Staley 2001, sp. nov.), *damsela*,
diabolicus, *diazotrophicus*, *ezurae* (Sawabe *et al.* 2005, sp. nov.), *fischeri*,
fluvialis, *fortis* (Thompson *et al.* 2003, sp. nov.), *furnissii*, *gallicus* (Sawabe
et al. 2004, sp. nov.), *gigantis* (Le Roux *et al.* 2005, sp. nov.), *harveyi*,
hepatarius (Thompson *et al.* 2003, sp. nov.), *hispanicus* (Gomez-Gil *et al.*
2004, sp. nov.), *hollisae*, *ichthyoenteri*, *iliopiscarius*, *kanaloe* (Thompson
et al. 2003, sp. nov.), *lentus* (Macián *et al.* 2001, sp. nov.), *logei*, *marinus*,
mediterranei, *metschnikovii*, *mimicus*, *mytili*, *natriegens*, *navarrensis*,
neonatos (Sawabe *et al.* 2005, sp. nov.), *neptunios* (Thompson *et al.* 2003,
sp. nov.), *nereis*, *nigripulchritudo*, *ordalii*, *orientalis*, *pacinii* (Gomez-Gil *et al.*
2003, sp. nov.), *parahaemolyticus*, *pectenicida*, *pelagius*, *penaeicida*,
pomeroi (Thompson *et al.* 2003, sp. nov.), *ponticus* (Macián *et al.* 2005, sp.
nov.), *proteolyticus*, *rotiferianus* (Gomez-Gil *et al.* 2003, sp. nov.), *ruber*
(Shieh *et al.* 2003, sp. nov.), *rumoiensis*, *salmonicida*, *scophthalmi*, *shilonii*
(corrig. Kushmaro *et al.* 2001, sp. nov.), *splendidus*, *succinogenes*,
superstes (Hayashi *et al.* 2003, sp. nov.), *tapetis*, *tasmaniensis* (Thompson
et al. 2003, sp. nov.), *trachuri*, *tubiashii*, *viscosus* (Lunder *et al.* 2000, sp.
nov.), *vulnificus*, *wodanis* (Lunder *et al.* 2000, sp. nov.), *xiii* (Thompson *et al.*
2003, sp. nov.). De éstas especies, 12 son reconocidas como patógenas
humanas: *Vibrio cholerae* (O1, no-O1, O139, entre otras), *Vibrio mimicus*,
Vibrio fluvialis, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio*

cincinnatiensis, *Vibrio hollisae*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio damsela*, *Vibrio metschnikovii* y *Vibrio carchariae*.^{28, 31}

El género *Vibrio* se encuentra constituido por bastones rectos o curvos de 0.5-0.8 µm de diámetro por 1.4–2.6 µm de longitud. Sin embargo, es de notar que, las formas de involución se presentan normalmente en cultivos viejos o bajo condiciones adversas de cultivo. En medios líquidos de cultivo presentan movilidad mediante flagelos polares monótricos o multítricos, y la mayoría puede crecer en un medio mineral que contenga D-glucosa y NH₄Cl. La fermentación de D-glucosa resulta en la elaboración de productos terminales ácidos pero, generalmente, ningún gas. Todas las especies del género utilizan D-fructosa, maltosa y glicerol. Además, los iones Na⁺ estimulan el crecimiento de todas las especies y son un requerimiento absoluto para la mayoría variando la concentración mínima necesaria para su crecimiento óptimo entre 5 a 700 mM. Todas las especies crecen a 20° C y la mayoría a 30° C, y aunque pueden ser encontradas en ambientes acuáticos con una amplia gama de salinidades, son muy comunes en ambientes marino y estuarino (tales como deltas, marismas de marea y pantanos de manglar) y aún sobre la superficie y dentro del contenido intestinal de animales marinos. Algunas especies también se encuentran en ambientes de agua dulce.²⁷

3 *Vibrio parahaemolyticus*

Es un microorganismo mesófilo y ligeramente halófilo cuyo crecimiento y supervivencia son típicos de la mayoría de los vibrios mesófilos que se presentan de modo natural. Se encuentra en las aguas marinas cercanas a la costa en la mayoría de los países tropicales y templados y con frecuencia se halla asociado con moluscos, crustáceos y peces.⁴¹

Vibrio parahaemolyticus fue identificado por primera vez como agente de gastroenteritis por Fujino *et al.* (1951), quienes originariamente encuadraron el organismo en el género *Pasteurella*. Sin embargo, la denominación actual fue establecida por Sakazaki *et al.* (1963). La bacteria no crece en los medios a los que no se les añade NaCl y por esta razón fue pasado por alto por los métodos clásicos de investigación de la enfermedad entérica.⁴¹

La bacteria es agente etiológico de cuadros intestinales que presentan diarrea que, en ocasiones, es disenteriforme (heces sanguinolentas con mucus), a veces causa náuseas, vómitos, fiebre y cefalea. La infección por ésta bacteria está calificada como un cuadro clínico grave a moderado, la enfermedad tiene un tiempo de duración de 1 a 7 días y son raros los casos en los que causa la muerte (Anexo 6).³

El *Vibrio parahaemolyticus* patogénico produce una hemolisina directa termoestable (TDH), que es el producto del gen *tdh*. Se dice que más del 90% de aislamientos de muestras clínicas de *V. parahaemolyticus* pero menos del 1% de las cepas de alimentos o ambientales produce TDH o posee *tdh*. Por su parte, la frecuencia de detección de TDH o la detección de *tdh* en muestras ambientales y alimentos marinos varían del 0% a 6%. También puede presentar el gen *trh* (de la hemolisina relacionada al *tdh*) así como el gen de la hemolisina termolábil (*tlh*).²⁴

4 La pandemia de los vibrios

El análisis de la naturaleza y evolución de las pandemias, en general y, relativas al género *Vibrio*, en particular, nos brinda la posibilidad de comprender las causas y mecanismos por los cuales los microorganismos causantes se diseminan mundialmente tales como factores ambientales y

de saneamiento incluyendo la participación de los alimentos en su extensión mundial.⁵⁶

Al género *Vibrio* pertenece uno de los patógenos intestinales más importantes para el hombre: *Vibrio cholerae* responsable de epidemias y pandemias de enfermedades diarreicas de riesgo mortal.¹¹

Hoy se habla con gran conocimiento de causa de la existencia de ocho pandemias relativas a *Vibrio cholerae* (Fig. 1). La primera pandemia comenzó en la India en 1817, y se desplazó hacia el sur de Rusia hacia Polonia, Turquía y países Árabes. Mas tarde, entre la segunda y la sexta pandemia la bacteria había sido hallada absolutamente en todos los continentes. La séptima pandemia, aún existente, se inició en 1961 en las Islas Célebes de Indonesia, y presentó una primera etapa (1961–1966) de progresión lenta y la segunda a partir de los años setenta, rápida, afectando Asia, África, Europa y América Latina. En esta última, la diseminación fue muy acelerada a partir de enero de 1991 en que ocurrieron los primeros casos en el Perú.^{42, 61}

La octava pandemia se habría iniciado en 1993 en Calcuta propagándose a Madrás y Bangladesh. Se extendió por el subcontinente indio ocurriendo epidemias en China, Tailandia y Malasia. A éste respecto, recientemente inclusive se identificó un vibrión en costas de Chile.^{23, 38}

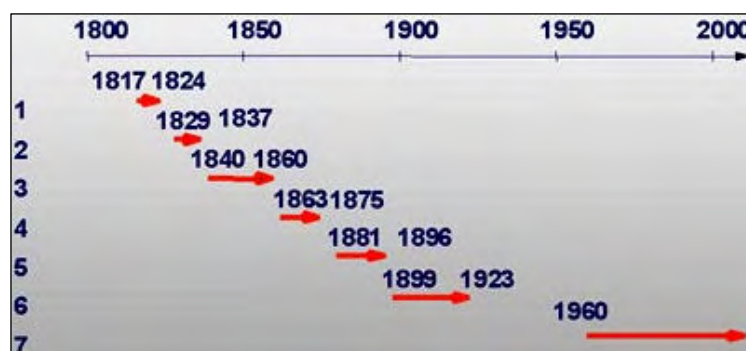


Fig 1. Cronología de las Pandemias de Cólera

Otro patógeno intestinal del mismo género, con características de pandemia, es el *Vibrio parahaemolyticus*, el cual ha sido aislado de agua de mar, organismos marinos y de las heces de los enfermos con enteritis agudas. Las infecciones causadas por el citado miembro del género *Vibrio* se han incrementado mundialmente en los últimos 10 años. Su diseminación abarca actualmente cuatro continentes: Asia, América, África y Europa. Tal diseminación no había sido reportada anteriormente, haciéndose evidente que estamos frente a una pandemia de gastroenteritis causada por dicha bacteria.^{11, 17, 53}

En Febrero de 1996, un incremento inexplicable en la incidencia de *Vibrio parahaemolyticus* fue observado entre pacientes hospitalizados en Calcuta, India. El análisis de las cepas reveló que una cepa de ésta bacteria que no había sido aislada previamente por el sistema de vigilancia en Calcuta, era la causante de 50 a 80% de los casos. Su tendencia pandémica se hizo evidente cuando comenzó a reportarse su aislamiento de muestras clínicas en rápida sucesión en Taiwán, Laos, Japón, Tailandia y Corea.^{5, 50}

Desde el descubrimiento del clon pandémico de *V. parahaemolyticus* se han centrado los esfuerzos en identificar el (o los) factor (es) determinantes de este potencial pandémico. No se han observado diferencias en la producción de la hemolisina directa termoestable (TDH) ni diferencias significativas entre el porcentaje de sobrevivencia en similares condiciones de stress medioambientales (temperaturas extremas, pH bajo, y alta salinidad), entre las cepas pandémicas y no pandémicas de *V. parahaemolyticus*.^{50, 67}

De un potencial de 71 combinaciones de serotipos O:K, hoy en día reconocidas para *V. parahaemolyticus*, 28,2% han adquirido el potencial pandémico. La tipificación por secuencia de multilocus ha proporcionado un

fuerte soporte molecular para establecer el origen clonal del *V. parahaemolyticus* O3:K6 pandémico, y las cepas pandémicas, independientemente del serotipo, son clonales, con la base de un perfil alélico idéntico y evidenciando que sólo el serotipo no puede definir adecuadamente una cepa pandémica.¹⁸

Paralelamente al estudio de *Vibrio parahaemolyticus*, otros extraordinarios acontecimientos han ocurrido en relación con las especies patógenas de *Vibrio*. En el verano de 1996, una epidemia importante de infecciones sistémicas causadas por *V. vulnificus* se presentó entre trabajadores de un mercado de pescados y consumidores de los mismos en Israel. El análisis molecular reveló que esta cepa se generó mediante la hibridación del genoma entre dos formas preexistentes de *V. vulnificus* no patógenos, lo que aparentemente derivó en la emergencia de una epidemia causada por la variante patogénica de reciente evolución. Del mismo modo, el origen de la octava pandemia de *V. cholerae* con la aparición de nuevos híbridos entre *V. cholerae* O1 clásico y el biotipo El Tor reportada en Matlab, Bangladesh y Mozambique como se detalló anteriormente.^{1, 7, 8, 52}

La pandemia de *V. parahaemolyticus* ofrece una inapreciable oportunidad para analizar los factores que favorecen y perpetúan una pandemia y además comprender aquellos factores que contribuyen al decrecimiento de una pandemia cuando aún está sucediendo. En suma, es un momento en que una juiciosa conjunción de microbiología básica y aplicada revelará por qué tales eventos ocurren, y con estudios epidemiológicos perceptivos, seremos capaces de combatir, y quizás prevenir, la diseminación de este nuevo patógeno emergente.⁵³

4.1 Situación en el mundo

Desde 1951, en que Fujino *et al.* reportaran la primera intoxicación alimentaria debida a *Pasteurella parahaemolytica*, más tarde llamada *Vibrio parahaemolyticus* por Sakazaki *et al.* en 1963, a la fecha se cumplen 55 años de innumerables esfuerzos que se han venido realizando alrededor del mundo para la comprensión de la naturaleza de *Vibrio parahaemolyticus* ya sea a través de investigaciones sobre su perfil microbiológico o de acciones nacionales, regionales e internacionales para controlar su desarrollo de tal manera que no signifique un riesgo grave para la salud.⁹

Es así que, en Gran Bretaña en 1977 ya se reportaba la distribución de *Vibrio parahaemolyticus* en aguas costeras británicas. En Indonesia también se analizaban muestras de lodo, moluscos y pescados en 1974. Así mismo, Urdaci en Francia publicaba en 1988, el análisis de especies del género *Vibrio* asociadas con productos marinos de la Bahía de Arachon. Mientras que, en 1995, en la costa Adriática Italiana se encontraba *V. parahaemolyticus* como segunda especie predominante después de *V. alginolyticus* y, en 1999, se analizaba el mismo año la presencia de *V. parahaemolyticus* patogénico en mejillones y aguas costeras en Francia y se identificaba el rasgo positivo para hemolisina directa termoestable (TDH) a partir de ostras crudas en España. Poco después, se publicaba, en el año 2001, la caracterización de *Vibrio parahaemolyticus* aislado de pescados en Kenia debido al incremento de brote de intoxicaciones asociados a éste microorganismo. Durante 1997 a 1998, estudios moleculares demostraron la presencia de por lo menos tres distintas variantes de

V. parahaemolyticus. Paralelamente, fueron reportados aislamientos similares a aquellos obtenidos en 1996 en Calcuta en brotes asociados a alimentos y casos esporádicos en Bangladesh, Chile, Japón, Corea, Laos, Rusia, Taiwán, Tailandia y Estados Unidos de América (EE.UU). 4, 6, 9, 21, 36, 44, 46, 53, 63, 65

Desde 1988, el Centro para el Control de Enfermedades (CDC) de EE.UU. ha mantenido un sistema de vigilancia para infecciones por *Vibrio* a lo largo de las costas del Golfo correspondientes a Alabama, Florida, Luisiana y Texas y más tarde a las costas del Pacífico y Atlántico. 25, 26

Durante julio y agosto de 1997, ocurrió el brote reportado más grande en Norte América de infecciones por *Vibrio parahaemolyticus*. La enfermedad presentada en 209 personas fue asociada al consumo de ostras crudas en California, Oregon y Washington (EE.UU.) y en Columbia Británica (Canadá); una persona falleció. Anteriormente, sólo se habían presentado 345 casos esporádicos entre 1973 y 1998. 12, 14, 22

Mucho más cerca al Perú, en Chile, la incidencia de *Vibrio parahaemolyticus* como agente de enterocolitis también había sido esporádica hasta noviembre de 1997 en que se produjo el primer brote causado por mariscos contaminados en Antofagasta; durante los siguientes meses ésta situación se repitió en Iquique, y casi todo el litoral norte Chileno. El brote fue más agudo entre enero y febrero de 1998 en que se registraron 208 casos; en total hasta abril de 1998 se confirmaron 297 casos clínicos y se aisló *V. parahaemolyticus* de

diversos mariscos bivalvos de las regiones afectadas, especialmente choros y almejas.²⁰

En el año 2004, se determina por primera vez la llegada de las variantes pandémicas de *V. parahaemolyticus* al continente Europeo a través de España, y en el año 2005 el clon pandémico fue asociado con casos hospitalizados de diarrea en Mozambique, África del Este, sin embargo, también fueron aisladas cepas O3:K6 con rasgos moleculares del clon pandémico a partir de fuentes ambientales en la costa francesa. En el sur y zona central de Chile, se reportaron ese año más de 10.000 casos de infección por *V. parahaemolyticus* debido a grandes epidemias de diarrea asociadas al consumo de productos marinos tal como las ocurridas en los veranos de 2004 y 2005 en Puerto Montt, Chile.^{1, 33, 49, 53, 57, 58, 59}

En el medio ambiente, la detección de *V. parahaemolyticus* virulento en un universo predominante de *V. parahaemolyticus* avirulento, constituye un gran problema. El recuento total indiferenciado de *V. parahaemolyticus* es usado como indicador para el control de contaminación de alimentos y con el objetivo de prevenir infecciones. Claramente, es un indicador inadecuado como se ha comprobado en los brotes epidémicos ocurridos en EE.UU. donde, pese al monitoreo bacteriológico en sitios de recolección y a pesar de que el número de *V. parahaemolyticus* era inferior al permisible 10.000 Número Más Probable (NMP), los brotes epidémicos no han podido ser evitados.⁵⁵

4.2 Situación sanitaria en el Perú

Debido a que *Vibrio parahaemolyticus* también ha sido ampliamente asociado a incrementos de temperatura se avala la hipótesis de que su

abrupto desarrollo estaría relacionado al alza de temperatura del agua de mar por la corriente de El Niño la que también se vería reforzada por la elevada contaminación de las aguas costeras en muchas zonas del litoral peruano. ^{14, 20}

El Niño, un fenómeno que los peruanos hasta hace poco pensábamos era peculiar sólo a nuestras costas, hoy en día se reconoce como un fenómeno mundial. La manifestación más característica e importante del fenómeno de El Niño es el calentamiento de la zona central y oriental del Pacífico ecuatorial y bastan 2° C para declarar un fenómeno de El Niño (Fig. 2). Cabe notar que en 1999, cuando se tomaron las muestras del presente trabajo de tesis, la temperatura marina se encontraba en un nivel marcadamente menor que en 1997 y 1998 en que ocurrió éste fenómeno (con variaciones térmicas de hasta 5° C en aquel entonces). Actualmente, en los últimos meses del 2006, se observa una clara “fase de formación” de un episodio de El Niño entre débil y moderado con tendencia a acentuarse a principios de 2007 de acuerdo a los pronósticos de profesionales de la materia (Fig. 3). Es interesante observar la aparición cada vez más frecuente del fenómeno de El Niño lo cual puede estar siendo ocasionado por el calentamiento global de nuestro planeta teniendo una repercusión negativa en los niveles de *Vibrio parahaemolyticus* en el Perú y a nivel mundial. ^{54, 68}

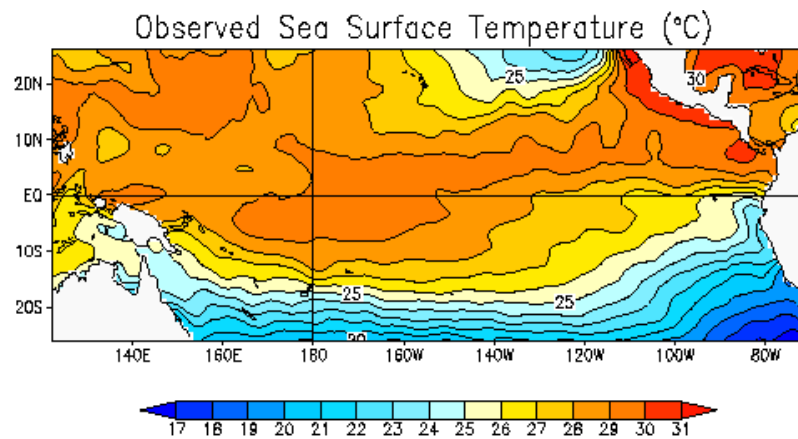
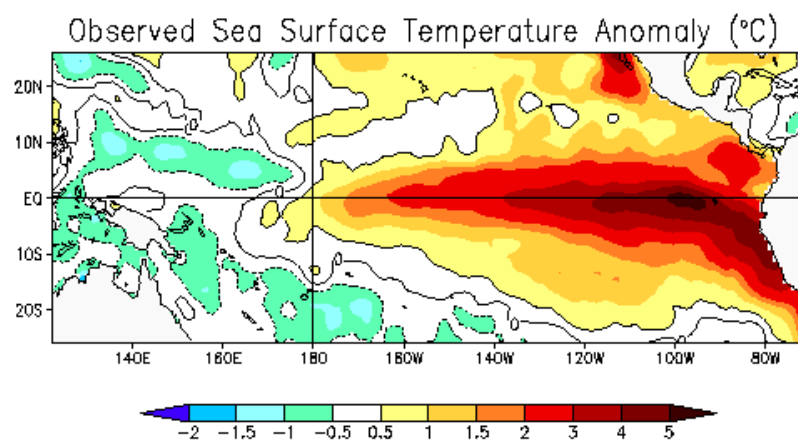


Fig. 2. Variaciones de temperatura. El Niño 1997-1998 (68)



Centro Nacional de Predicción Ambiental (NCEP) NOAA
20 Agosto , 1997



Fig. 3. Pronóstico Fenómeno El Niño. (Ing. William Alva. Prensa)

Las aguas marítimas de muchas ciudades costeras cuyos desagües sin tratar desembocan en el mar tienen características tales como: alta salinidad, temperatura, estratificación de las aguas y masiva liberación de aguas servidas en los puntos de descarga. Especialmente es el caso de Lima que como capital de la república posee una alta concentración demográfica y en sus costas desembocan desagües como el colector Sur de Lima Metropolitana de donde proviene la mayoría del pescado para el consumo de Lima provocando una contaminación de dimensiones aún no determinadas de manera oficial.⁴⁸

En el Perú, la zona costera ha generado en las últimas décadas oportunidades y servicios al poblador de ésta parte del territorio con el consiguiente deterioro ambiental. De los cerca de 28 millones de habitantes del Perú, el 72,3% conforma los centros urbanos y el 52,1% habita en la costa siendo Lima Metropolitana, una ciudad que alberga cerca de 8 millones de habitantes, una de las más pobladas del Perú. A todo ello, se suman los ríos que en número de 53 atraviesan las áridas tierras de las costas presentando diferentes niveles de alteración de la calidad ambiental, en sus cuencas hidrográficas, cuyas aguas son finalmente vertidas al mar.²

Por otro lado, las fuentes de contaminación marina de origen terrestre las constituyen principalmente, las aguas residuales domésticas, entre otros. Cada segundo, 18 mil litros de aguas servidas contaminan las costas de la ciudad de Lima Metropolitana. Sólo el 7.5% del total (18.7 m³/s) es tratado (1.4 m³/s), y el resto va del inodoro al mar (Fig. 4).⁴⁷



Emisor Comas	2.5 m ³ /s
Emisor Centenario	4.7 m ³ /s
Emisor Costanero	3.7 m ³ /s
Emisor Surco	6.5 m ³ /s
Colector N°6:	
Tayacaja (Pte. Huáscar)	0.3 m ³ /s
Condevilla (A 100 m Pte. Faucett)	0.5 m ³ /s
Bocanegra (cdra. 46 Av. Gambetta)	0.5 m ³ /s
Total	18.7 m³ /s
Fuente: SEDAPAL.	

Fig. 4. Mapa de descargas y plantas de tratamiento de aguas servidas y volumen de descargas en m³/s. (Sedapal, Lima)

En conclusión, es evidente que en el Perú, factores ambientales tales como el calentamiento global y fenómenos ambientales como El Niño aunados a prácticas deficientes de saneamiento ambiental favorecen la diseminación de microorganismos tales como *Vibrio parahaemolyticus*.¹¹

5 Grupos biológicos involucrados

Principalmente se detecta *Vibrio parahaemolyticus* en especies de pescados, moluscos y crustáceos y puede relacionarse con los hábitos alimenticios o de higiene y con la naturaleza misma del ciclo de vida de las especies mencionadas. Por ejemplo, en lugares como Japón, la infección por ésta bacteria es la causa principal de gastroenteritis epidémica, pues el pescado es consumido crudo. En aquella área geográfica, los alimentos

frecuentemente involucrados en brotes han sido pescados, ostras, cangrejos, camarones y langostas cocinados antes de ser consumidos. Así mismo, éstos brotes fueron probablemente causados por refrigeración incorrecta, cocinado insuficiente, contaminación cruzada o recontaminación.²⁹

Cabe precisar que, los mariscos (crustáceos y moluscos) son especies marinas alimenticias económicamente importantes encontradas en abundancia en aguas marinas y estuarinas. Además de que generalmente, éstos organismos que se alimentan filtrando el agua, pueden concentrar bacterias patógenas y virus, de modo que la calidad microbiológica de los mariscos, así también como las de los demás grupos biológicos, se ven directamente afectadas por las descargas de aguas servidas en las aguas costeras. Más aún, dichas especies son frecuentemente consumidas crudas o ligeramente cocinadas, estableciendo un riesgo para la salud humana.⁶²

La Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (ICMSF) configura 15 categorías para los alimentos (Anexo 4), de acuerdo a la clase de peligro determinado por variables propias y por aquellas relacionadas a las condiciones de manipulación y consumo y califica a *Vibrio parahaemolyticus* como un organismo moderadamente peligroso de difusión potencialmente extensa. Su densidad en el ambiente y alimentos marinos varía enormemente de acuerdo a la estación, lugar, tipo de muestra, contaminación fecal, y metodología analítica. Cabe precisar que, cuando el alimento (pescado o marisco) se consume cocido es de peligrosidad reducida (categoría 10) y si se consume crudo o insuficientemente cocido es de peligrosidad aumentada (Categoría 12) (Anexo 4). Además, *Vibrio parahaemolyticus* pertenece a un grupo especial, debido a que si bien generalmente se transmite por la ingestión de

alimentos específicos, su difusión secundaria a otros alimentos se realiza a través de contaminación cruzada dentro del área de preparación de ellos. ³,

41

II PARTE EXPERIMENTAL

El desarrollo del análisis microbiológico fue llevado a cabo entre noviembre de 1999 y abril de 2000 en las instalaciones del Centro Latinoamericano de Enseñanza e Investigación en Bacteriología Alimentaria (CLEIBA) y la colaboración de la unidad del Servicio Asistencial de Análisis Clínicos (SAAC) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

1 PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS Y METODOLOGÍA

El muestreo se realizó según los estándares de la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (ICMSF) y el análisis microbiológico según la metodología recomendada por la Administración de Alimentos y Drogas (FDA). ^{30, 41}

2 EQUIPOS Y MATERIALES

2.1 EQUIPOS

- Homogeneizador Stomacher marca Colworth 400
- Microscopio eléctrico estereoscópico marca Leitz Wetzlar
- Centrífuga marca Hettich Universal II
- Incubadora marca Memmert
- Autoclave marca Miraval
- Balanza eléctrica analítica marca Ohaus (Sensibilidad 0.1 g)
- Baño de agua marca Memmert
- Equipo de filtración al vacío marca Precision
- Horno bacteriológico marca Memmert
- Contador de colonias marca Quebec
- Caja térmica marca Tag Along

2.2 MATERIALES

- Pipetas de 1 mL, 5mL y 10 mL (Graduadas al 0.1 mL)
- Probetas de 50 mL, 100 mL y 500 mL
- Matraces de 25 mL, 50 mL 250 mL y 500 mL
- Varillas de vidrio
- Láminas portaobjetos
- Bandejas metálicas
- Mechero Bunsen
- Bolsas de polietileno
- Bolsas de polietileno para homogeneizador
- Juego de bisturís y pinzas
- Tubos de 16x150 mm, 10x100 mm y 13x100 mm
- Tubos de fermentación (Durham) de 10x75 mm
- Placas de Petri de vidrio de 100x15 mm
- Gradillas
- Tiras de papel (de filtro) para prueba de oxidasa
- Discos de papel (de filtro) para prueba de vibriostático
- Algodón
- Tapones de plástico
- Termómetro
- Papel Kraft
- Asas y agujas de inoculación

3 MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS EMPLEADOS

Los medios de cultivo microbiológico y reactivos usados fueron los recomendados por la Administración de Drogas y Alimentos de EE.UU. (FDA). Éstos, que a continuación se mencionan, deben ser grado analítico

a menos que se indique otra cosa. Cuando se especifica el uso de agua se debe entender por agua destilada o agua deionizada libre de sustancias que pueden inhibir el crecimiento bacteriano en las condiciones de prueba.³⁰

Así mismo, las condiciones de esterilización en la preparación de los medios y reactivos fueron a 121° C y 15 lb de presión durante 15 minutos a menos que el modo de preparación y/o esterilización del medio indicase lo contrario. (Anexo 3)

3.1 MEDIOS DE CULTIVO MICROBIOLÓGICOS

- Solución salina fosfatada (PBS)
- Agua peptonada alcalina (APW) +2% NaCl
- Agar TCBS (Agar selectivo para *Vibrio*) Merck
- Agar tripticasa de soya (TSA) Merck + 2% NaCl
- Agar gelatina (GA)
- Agar gelatina más sal (GS)
- Medio semisólido para prueba de motilidad + 2% NaCl
- Medio inclinado de arginina-glucosa (AGS) + 2% NaCl
- Agar hierro-tres azúcares (TSI) Merck + 2% NaCl
- Caldo tripticasa de soya (TSB) + 0% NaCl
- Caldo tripticasa de soya (TSB) + 3% NaCl
- Caldo tripticasa de soya (TSB) + 6% NaCl
- Caldo tripticasa de soya (TSB) + 8% NaCl
- Caldo tripticasa de soya (TSB) + 10% NaCl
- Caldo rojo de metilo-Voges Proskauer Merck (RM - VP)
- Caldo púrpura de bromocresol + Sacarosa
- Caldo púrpura de bromocresol + Lactosa

- Caldo púrpura de bromocresol + D-Manitol
- Caldo púrpura de bromocresol + Manosa
- Caldo púrpura de bromocresol + Arabinosa
- Caldo púrpura de bromocresol + Celobiosa
- Medio oxidativo–fermentativo (OF) Hugh–Leifson
- Agar úrea de Christensen Merck
- Agar Wagatsuma

3.2 REACTIVOS Y OTROS

- Reactivo para prueba de oxidasa
- Reactivo para prueba de sensibilidad al vibriostático (O/129)
- Reactivo para prueba ONPG
- Cloruro de sodio
- Sacarosa
- Lactosa
- D–Manitol
- Manosa
- Arabinosa o celobiosa
- Aceite mineral estéril
- Sangre humana (sólo eritrocitos)
- Cristal violeta
- Lugol
- Alcohol acetona
- Safranina.

4 PROCEDIMIENTO

4.1 NATURALEZA Y PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS

Se analizó un total de 50 muestras que comprendieron especies de pescados, moluscos y crustáceos procedentes de los principales terminales pesqueros de Lima y Callao; a saber, Terminal Pesquero de Villa Maria del Triunfo, Muelle de Pescadores de Chorrillos, Terminal Pesquero de Ventanilla, Muelle de Pescadores del Callao y supermercados de Lima. Las especies de pescado analizadas fueron: “Mojarrilla”, “pintadilla”, “mimí”, “lorna”, “chita”, “cojinova”, “pampanito”, “sardina”, “machete”, “caballa”, “jurel” y “allanque” o “cachema”. Entre los moluscos, animales de naturaleza sésil, se incluyeron “choros”, “conchas de abanico”, “mejillones”, “almejas”, “conchitas”, “conchas negras”, “percebes”, “caracoles”, “ostras”, “palabritas” y “navajas”. Y finalmente entre los crustáceos, animales poseedores de un exoesqueleto, se trabajó con “langostinos”, “cangrejos” y “camarones” (Anexos 1 y 2).^{39, 40}

4.2 RECOLECCIÓN Y MANIPULACIÓN DE LAS MUESTRAS

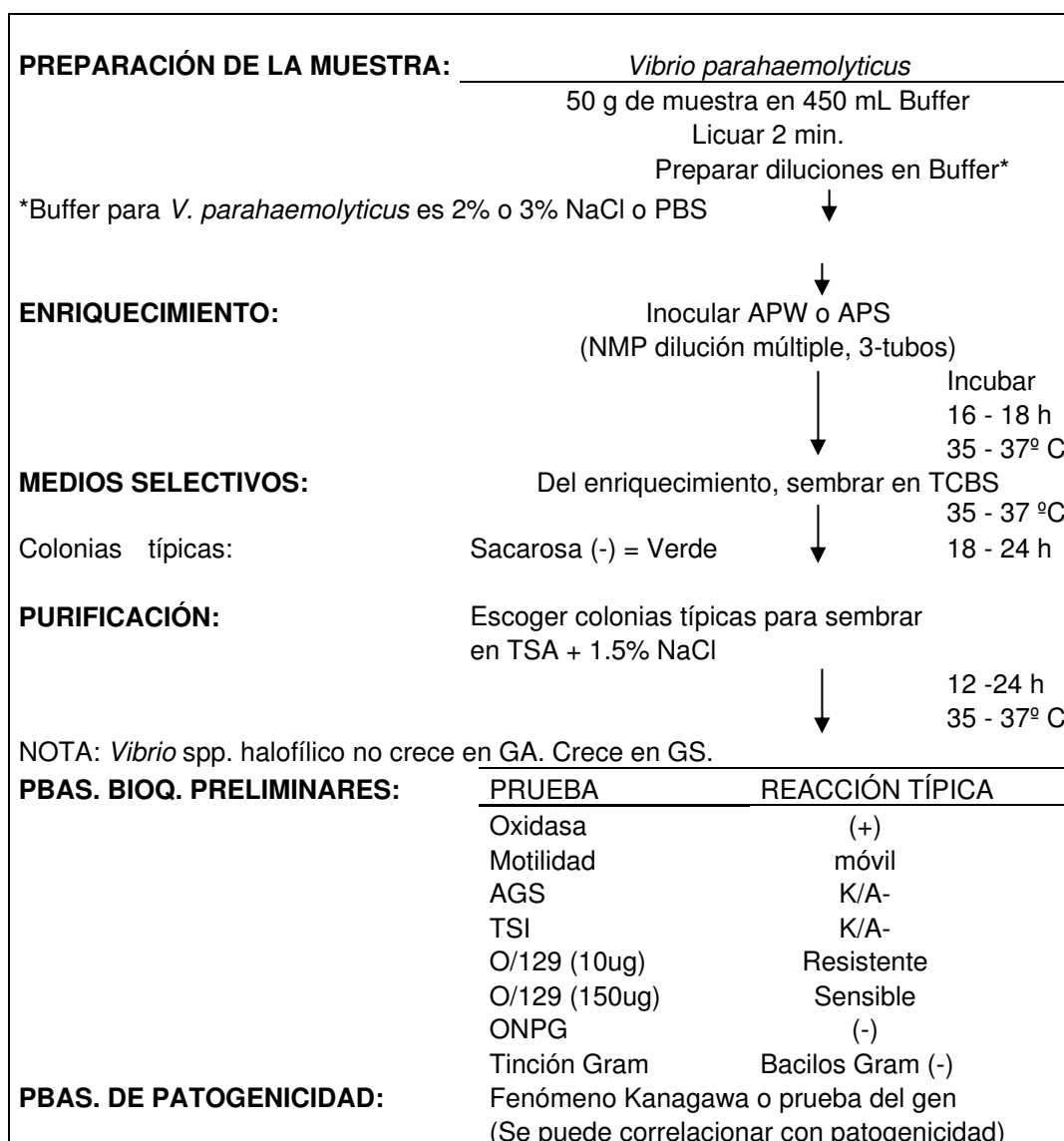
Entre noviembre y diciembre de 1999 se procedió a la recolección de las muestras en los lugares previamente mencionados colocando cada muestra, por especie, en bolsas de polietileno de primer uso y transportadas en cajas isotérmicas con gel refrigerante en su interior para iniciar el análisis dentro de las siguientes 4 horas. (Fig. 5)

4.3 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Como se detalló anteriormente, dependiendo de la naturaleza del animal, se tomó en cuenta:

En pescados: la piel y agallas, en crustáceos: el animal entero y en moluscos: la parte interna del animal tal como se puede apreciar en el siguiente esquema:

DIAGRAMA ESQUEMATICO PARA EL MÉTODO DE *Vibrio parahaemolyticus*



Para cada muestra, se preparó asépticamente diluciones 1:10 de 50 g de la especie marina en 450 mL de PBS (Anexo 3: M1) que tenía un 2% de NaCl y un pH de 7.2 a 7.5. Ésta dilución, contenida en una bolsa para homogeneizador, se sometió a la acción del homogeneizador para ser debidamente triturada durante 2 minutos. (Figs. 6 y 7)



Fig. 5. Recolección de muestras

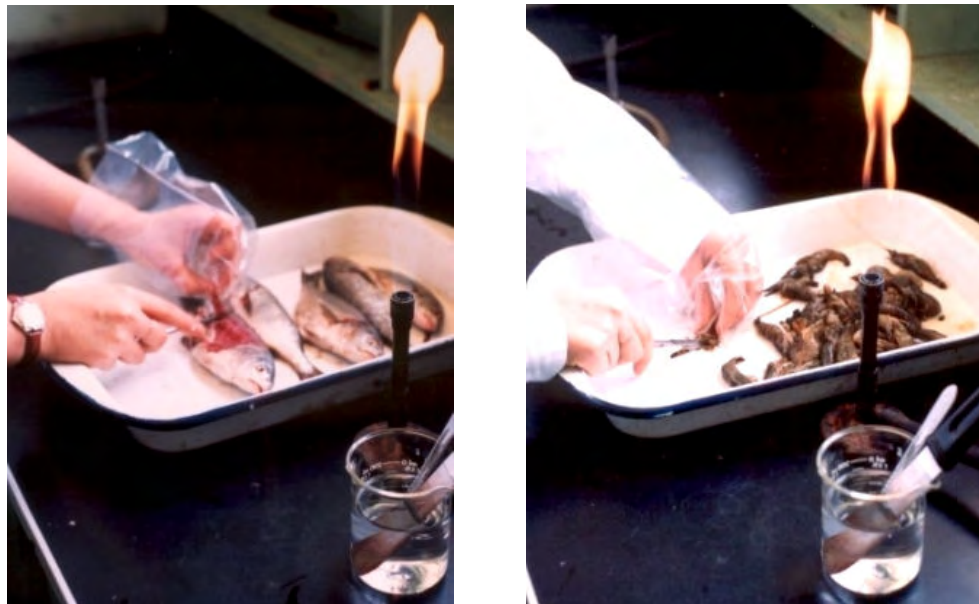


Fig. 6. Preparación de muestras



Fig. 7. Preparación de muestra en homogenizador

4.3.1 Enriquecimiento

Seguidamente, 1 mL del homogenado obtenido se inoculó en 9 mL de APW (Anexo 3: M2) preparados previamente en tubos de ensayo con 2% de NaCl.

Se requirió una batería de 9 de éstos tubos con APW para trabajar a 3 diluciones, por el método del Número Más Probable (NMP). Dichas inoculaciones fueron realizadas dentro de los 20 minutos. Se incubó a 35–37° C por 18 horas.³⁰

4.3.2 Crecimiento en TCBS

Luego del tiempo de incubación en APW, se procuró manipular las baterías de enriquecimiento evitando sacudirlas o someterlas a movimientos bruscos para proceder a escoger las diluciones que presentaron turbidez.

Para todas las diluciones que tuvieran un tubo turbio y al menos una dilución mayor, se sembró en agar selectivo TCBS (Anexo 3:

M3). La incubación en TCBS se realizó a 35–37° C por 24 horas. Al cabo del tiempo de incubación mencionado, se procedió a observar el crecimiento en TCBS en búsqueda de colonias que presenten las características típicas de *V. parahaemolyticus* de ser colonias redondas y de diámetro mediano (2–3 mm), de color verde turquesa, brillantes, lisas y algo aplanadas con centro verde o azul. (Fig. 8)

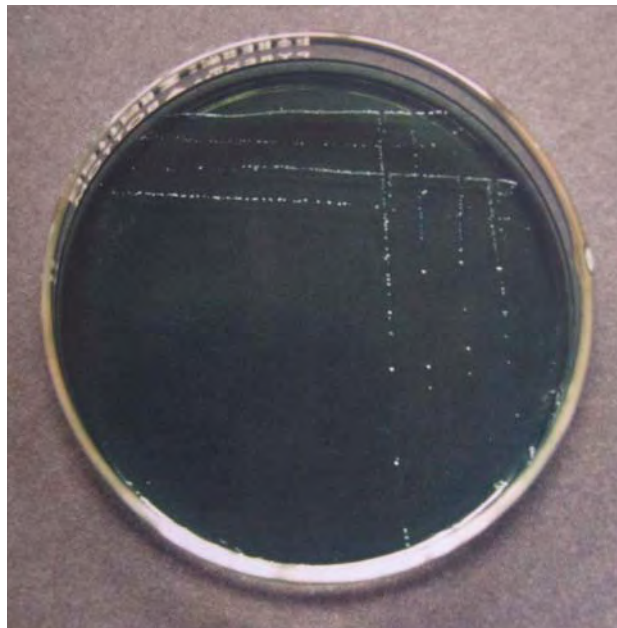


Fig. 8. *Vibrio parahaemolyticus* en medio TCBS

4.3.3 Purificación en GA y GS

Las cepas sospechosas provenientes del TCBS fueron repicadas en GA y en GS (Anexo 3: M4 y M5) a manera de purificación de falsos positivos para *V. parahaemolyticus*. La mayoría de *Vibrio* spp. son gelatinasa positivos al hidrolizar la gelatina. Sin embargo, los vibrios halofílicos crecen sólo en GS por lo que sólo se conservaron las cepas que presentaron crecimiento en GS rechazando las que crecieron en agar gelatina (GA), aún cuando hayan presentado crecimiento en agar gelatina sal (GS). Las

colonias lucían un aspecto transparente; eran lisas y redondeadas.

4.4 ANÁLISIS BIOQUÍMICOS PRELIMINARES

4.4.1 Pruebas típicas generales

Se realizaron las siguientes pruebas iniciales de identificación a partir de cepas sospechosas con crecimiento en TSA durante 24 horas (Anexo 3: M6).

4.4.1.1 Tinción Gram:

Se siguió la técnica de tinción diferencial de Gram luego de la extensión y fijación del frotis. ⁴⁵

4.4.1.2 Prueba de la citocromo oxidasa:

Se colocaron 2 a 3 gotas del reactivo de oxidasa (Anexo 3, M7) sobre una pequeña cantidad de cada cepa sospechosa transferida sobre papel filtro humedeciéndolo. El desarrollo de un color azul oscuro dentro de 2 minutos indica un resultado positivo esperado para *Vibrio parahaemolyticus*.

4.4.1.3 Prueba de motilidad:

Con una aguja de inoculación se punzó el medio de prueba de motilidad (Anexo 3: M8) contenido en tubos hasta 2/3 de su profundidad dejándose incubar a 20–25° C durante 24 horas. *Vibrio parahaemolyticus* da resultado positivo observándose enturbiamiento longitudinal alrededor de la punción que se interpreta como motilidad positiva.

4.4.1.4 Arginina–glucosa inclinado (AGS):

Con una aguja de inoculación, se sembró el fondo y la superficie inclinada del medio AGS (Anexo 3: M9) en tubos que se incubaron a 37° C durante 24 horas. *Vibrio parahaemolyticus* presenta un color amarillo en el fondo debido a fermentación de glucosa mientras que la superficie presentó un color púrpura relacionado a alcalinidad. *Vibrio parahaemolyticus* no degrada la arginina al no poseer arginina dehidrolasa.

4.4.1.5 Triple azucar y hierro (TSI):

Con una aguja de inoculación, se sembró el fondo y la superficie inclinada del medio TSI (Anexo 3: M10) en tubos que se incubaron a 37° C durante 24 horas. *Vibrio parahaemolyticus* desarrolla un fondo de color amarillo, lo que indica la producción de ácido a partir de glucosa en condiciones anaerobias. El color rojo de la superficie inclinada indicó alcalinidad pues *Vibrio parahaemolyticus* no fermenta la lactosa ni la sacarosa.

4.4.2 Pruebas típicas específicas:

4.4.2.1 Prueba de sensibilidad al vibriostático O/129:

Se usó el método de difusión descrito para la sensibilidad a Polimixina B de *V. cholerae* O1 (Anexo 3, M11). Se usaron discos con concentraciones de 10 µg y 150 µg de vibriostático O/129 por mL y se colocaron en un área densamente sembrada en estrías en las placas de aislamiento (TSA con una concentración final de NaCl al

3%). *Vibrio parahaemolyticus* es sensible a 150 µg pero resistente a 10 µg.³⁰

4.4.2.2 Prueba de la β-galactosidasa:

A partir de un inóculo sembrado en TSI se suspendió cada cepa sospechosa en tubos conteniendo 0.25 mL de solución tamponada de ONPG 0.0133 M (Anexo 3: M12) que se llevó a incubación a 35–37° C por más de 24 horas antes de su lectura. El orto-nitrofenilgalactopiranosido (ONPG) ingresa al interior de la célula bacteriana y allí es metabolizado por la β-galactosidasa liberándose orto-nitrofenol, compuesto de color amarillo que indicó un resultado positivo por la presencia de la enzima β-galactosidasa responsable de la ruptura del disacárido lactosa en dos monosacáridos: glucosa y galactosa. *Vibrio parahaemolyticus* presenta resultado negativo al carecer de la enzima beta-galactosidasa.

4.5 PRUEBAS BIOQUÍMICAS COMPLEMENTARIAS

4.5.1 Crecimiento en Caldo Triptonado a 0%, 3%, 6%, 8%, 10% de NaCl:

A partir de cultivos en TSA, se inóculó cada cepa en tubos con TSB (Anexo 3: M13) conteniendo 0%, 3%, 6%, 8% y 10% de NaCl y se incubó a 35–37° C por 24 horas. Se consideró sólo el crecimiento profuso como resultado positivo. *Vibrio* spp halofílico no crece en caldo con 0% de NaCl, pero todos los *Vibrio* spp crecen en caldo conteniendo 3% NaCl. Varias especies tienen diferente tolerancia a la sal que puede ser usada para la identificación. *Vibrio*

parahaemolyticus no crece a 0% de NaCl. Crece profusamente a 3%, 6% y 8% de NaCl y escasamente a 10% de NaCl.

4.5.2 Crecimiento a 42° C:

Se inocularon tubos de TSB precalentados a 42° C conteniendo 3% de NaCl por 24 horas. Se consideró sólo crecimiento profuso como positivo. *V. parahaemolyticus* crece a ésta temperatura al igual que *V. cholerae*, *V. alginolyticus* y *V. vulnificus*.

4.5.3 Prueba de Voges–Proskauer:

Se utilizaron cepas crecidas en medio TSA inclinado que se inocularon en tubos de caldo MR–VP y se incubaron a 35–37° C por 2 días (Anexo 3: M14). Luego de la incubación, dicho caldo se utilizó para la reacción de Voges–Proskauer, que consistió en establecer la formación de acetil–metil–carbinol o acetoína, producida por los microorganismos, a partir de la glucosa con el reactivo de Barrit constituido por alfa–naftol y KOH. *Vibrio parahaemolyticus* presenta una reacción negativa a ésta prueba. Al igual que *V. vulnificus* y *V. fluvialis*.

4.5.4 Fermentación de carbohidratos:

A partir de crecimiento en tubos con TSA, se inocularon tubos con Caldo púrpura de bromocresol (Anexo 3: M15) conteniendo sacarosa, lactosa, D–manitol, manosa, arabinosa y celobiosa por separado. Se cubrió cada tubo con aceite mineral estéril y se incubó a 35–37° C por 5 días observándose el desarrollo de la prueba cada 24 horas. *V. parahaemolyticus* tiene una fermentación ácida en presencia de manosa, D–manitol y

arabinosa. La fermentación puede ser positiva o negativa con celobiosa y es negativa con sacarosa y lactosa.

4.5.5 Prueba de Hugh–Leifson:

Se inocularon tubos conteniendo medio de Hugh–Leifson (Anexo 3: M16) a partir de crecimiento de cepas sospechosas en TSA. Seguidamente, se incubaron a 35–37° C por 5 días observándose el desarrollo de la prueba cada 24 horas. *Vibrio parahaemolyticus* presenta una reacción de positiva respecto a la oxidación–fermentación de la glucosa.

4.5.6 Hidrólisis de la úrea:

Se analizaron las cepas sospechosas de *Vibrio parahaemolyticus* para conocer su capacidad hidrolítica inoculando tubos con agar urea de Christensen (Anexo 3: M17) e incubándolos a 37° C por 24 horas. La habilidad de éste microorganismo para hidrolizar la urea es variable y esto podría estar correlacionado con ciertos grupos somáticos (antígeno–O). Se consideró un resultado positivo al observar un cambio evidente del color del medio tornándolo rosado por hidrólisis de urea. (Fig. 9)

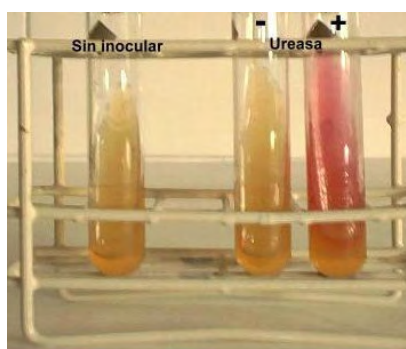


Fig. 9. Prueba de la Ureasa

4.6 PRUEBA DE PATOGENICIDAD:

Esta prueba se realizó en base al fenómeno Kanagawa que relaciona la patogenicidad de *Vibrio parahaemolyticus* con la presencia de una hemolisina directa termoestable (TDH) puesta de manifiesto en agar Wagatsuma (Anexo 3, M18).

Se inocularon pequeñas cantidades del caldo de cultivo procedente de TSB (+3% NaCl) de cada cepa sospechosa en placas duplicadas de agar Wagatsuma secado convenientemente. Se colocaron varias cepas en patrones circulares sobre las placas. Se incubaron a 37° C por 24 horas debiéndose proceder a la interpretación inmediatamente después del periodo de incubación a fin de obtener lecturas válidas.

Una reacción positiva se indicó por la presencia de un halo de unos 3 mm. o más, alrededor de la colonia observándose una zona transparente de beta-hemólisis marcadamente definida sin presencia de glóbulos rojos, de múltiples anillos concéntricos ni de tonalidades verdosas alrededor de la colonia. Las colonias productoras de zonas claras de hemólisis menores a 3 mm podrían ser débilmente patógenas.

III RESULTADOS

En la tabla 1 se reporta la distribución de especies marinas analizadas según su tipo y se da cuenta de los lugares en que fueron obtenidas las muestras entre noviembre de 1999 a abril de 2000. Se observa que del 100% de muestras tomadas (n=50) el 30% (n=15) correspondieron a pescados, el 58% (n=29) a moluscos y el 12% (n=6) a crustáceos procedentes de terminales pesqueros y supermercados de Lima y Callao.

Tabla 1. Distribución de muestras según el tipo y los lugares de muestreo

Tipo de muestra	Lugares de muestreo					Total Muestras
	Terminales		Muelles		SM	
	TP VMT	TP V	MP Ch	MP C		
Pescados	2	0	5	8	0	15 (30%)
Moluscos	10	3	0	4	12	29 (58%)
Crustáceos	3	2	0	1	0	6 (12%)
Total Muestras	15 (30%)	5 (10%)	5 (10%)	13 (26%)	12 (24%)	50 (100%)

CLEIBA. UNMSM. 2000

TP VMT: Terminal Pesquero de Villa María del Triunfo

MP Ch: Muelle de Pescadores de Chorrillos

TP V: Terminal Pesquero de Ventanilla

MP C: Muelle de Pescadores del Callao

SM: Supermercados de Lima metropolitana

En la tabla 2 se aprecian los valores de Número Más Probable (NMP) de *Vibrio parahaemolyticus* total y *Vibrio parahaemolyticus* Kanawaga positivo por g de muestra según los 3 grupos biológicos analizados, pescados, moluscos y crustáceos. En el caso de pescados, los valores de NMP para *Vibrio parahaemolyticus* total fueron un mínimo de 3/g y un máximo de 7,4/g mientras que el valor de NMP para *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa positivo fue de 3/g.

Así mismo, se obtienen resultados similares en cuanto a moluscos, donde los valores de NMP para *Vibrio parahaemolyticus* total fueron un mínimo de 3/g y un máximo de 7,4/g. El mismo resultado se observa en los valores de NMP para *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa positivo los cuales tuvieron un mínimo de 3/g y un máximo de 7.4/g.

Por último, en el caso de los crustáceos, el valor de NMP para *Vibrio parahaemolyticus* total fue de 3/g, el cual se repite en el NMP para *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa positivo.

Tabla 2. NMP de *Vibrio parahaemolyticus*. total Kanagawa positivo según grupos biológicos

Tipo de muestra	NMP <i>V.p.</i> total		NMP <i>V.p.</i> K+	
	mín.	máx.	mín.	máx.
Pescados	3	7.4	3	3
Moluscos	3	7.4	3	7.4
Crustáceos	3	3	3	3

CLEIBA. UNMSM. 2000

NMP= Número más probable por g de muestra

V.p. total= *Vibrio parahaemolyticus* total

V.p. K+= *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa positivo

En la tabla 3 se aprecia el hallazgo de *Vibrio parahaemolyticus* total y de *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa positivo donde n(%) es el número de muestra y el porcentaje hallado para cada uno de éstos dos rubros. Del 100% de muestras (n=50): Un 14% (n=7) de ellas presentaron *Vibrio parahaemolyticus* y un 8% (n=4) dieron positivo a la prueba de patogenicidad de Kanagawa.

Tabla 3. Distribución de *Vibrio parahaemolyticus* Total y Kanagawa positivo (K+) según tipo de muestra

Tipo de Muestra	Número de muestra n(%)	<i>V. parahaemolyticus</i> total n(%)	<i>V. parahaemolyticus</i> K+ n(%)
Pescados	15 (30)	3 (6)	1 (2)
Moluscos	29 (58)	3 (6)	2 (4)
Crustáceos	6 (12)	1 (2)	1 (2)
Total	50 (100)	7 (14)	4 (8)

CLEIBA. UNMSM. 2000

En la tabla 4 se observa más detalladamente la expresión de NMP en cuanto a los límites de confianza considerados de acuerdo a la manifestación de tubos positivos por cada muestra analizada.

Tabla 4. Detalle de NMP presente en cada muestra

Tipo de Muestra	Nro. de muestra	Cepas halladas	Tubos Positivos	Límites de Confianza		
				NMP/g	Bajo	Alto
molusco	1*	4	0 - 0 - 1	3	0.15	9.6
pescado	2	2	1 - 1 - 0.	7.4	1.3	0.15
molusco	3	1	1 - 0 - 0	3.6	0.17	18
pescado	7*	1	0 - 0 - 1	3	0.15	9.6
crustaceo	12*	1	0 - 0 - 1	3	0.15	9.6
molusco	17*	2	1 - 1 - 0.	7.4	1.3	20
pescado	28	1	0 - 1 - 0	3	0.15	11
TOTAL	7	12				

CLEIBA. UNMSM. 2000

*=Kanagawa Positiva

Con respecto a la patogenicidad, vemos en la tabla 5 los halos de beta-hemólisis (expresados en mm.) de cada cepa analizada a partir de las muestras correspondientes. Las medidas de dichos halos se encontraron entre 3 a 15 mm. considerándose como Kanagawa positiva a la cepa cuya medida fuera igual o mayor a 3 mm. A su vez, de aquí se desprende que las 4 muestras que presentaron positividad en el fenómeno Kanagawa

representaron el 57% del las 7 muestras donde se halló *V. parahaemolyticus* total.

Tabla 5. Patogenicidad de *Vibrio parahaemolyticus* en agar Wagatsuma

Muestra N°	Cepa N°	H.H. (mm)
3	35	2,5
2	6	2
	40	2.5
1	55*	10
	59	2.5
	60	2
	61*	4
7	81*	3
12	111*	15
17	217	2
	219*	3.5
28	353	1.5

CLEIBA. UNMSM. 2000

H.H.= Halo de hemólisis

*=Cepas Kanagawa positivas

Finalmente en la tabla 6 se presenta una sinopsis de las pruebas bioquímicas de *Vibrio parahaemolyticus*, donde cabe destacar el resultado positivo obtenido en la prueba de ureasa en 1 muestra del total de 50. Ésta positividad presente podría estar correlacionada con ciertos grupos somáticos (antígeno-O) y la presencia de los genes *trh* y/o *tdh*.³¹

IV DISCUSIÓN

En el presente trabajo de tesis, se reportó el recuento de *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa positivo hallado en especies marinas tales como pescados, moluscos y crustáceos procedentes de terminales pesqueros, muelles y supermercados de Lima Metropolitana y Callao. Éste trabajo fue concluido en el año 2000 luego de los primeros hallazgos de la bacteria en moluscos en 1974, pescados en 1976, en ambientes hialinos en 1981 y alimentos preparados en 1989, así como investigaciones de vibriones halofílicos en el litoral Peruano entre 1986 y 1987.^{10, 13, 35, 51, 66}

Los resultados reportados en otros estudios sobre *Vibrio parahaemolyticus* presentan similitudes así como contrastes con respecto a los resultados obtenidos en éste trabajo de tesis. En el presente análisis se obtuvo un 14% de *Vibrio parahaemolyticus* total aún en meses de primavera (noviembre y diciembre). Éste porcentaje coincide con el 14% de *V. parahaemolyticus* total obtenido en el estudio extensivo y colaborativo de Ayres y Barrow en el que se analizan mariscos procedentes de todas las costas de Gran Bretaña por un periodo de 2 años (1975 a 1976).⁴

Por un lado, en un estudio del 2001, realizado por Kagiko *et al.* en Kenia, observamos un recuento más bajo de *Vibrio parahaemolyticus* total de 4% (n=29) y todos con fenómeno Kanagawa negativo de 666 muestras de pescados de agua dulce y de mar. En éste caso se utiliza para el aislamiento el caldo Teepol sal glucosa (GTSB) y Triptona de soya cloruro de trifeniltetrazolium (TSAT). Además 27 de las 29 muestras positivas fueron parte de 62 muestras costeras. De igual modo, cabe notar el recuento más bajo en el estudio de Miranda que de 100 muestras de

pescados para consumo en Lima Metropolitana colectadas en los meses de verano, enero a abril de 1975, sólo se encuentra *Vibrio parahaemolyticus* total en 7 muestras (7%) usando agar TCBS y agar Teepol azul de bromotimol (BTB). Aún cuando Miranda no realiza el ensayo de Kanagawa dicho resultado puede deberse a que no se utilizó agar TCBS para la recuperación de *Vibrio parahaemolyticus* en el total de las muestras. El porcentaje más bajo aún obtenido por Kagiko que tampoco utiliza agar TCBS para todas sus muestras podría ser la razón por la que sus recuentos tuvieron dichos resultados. Éstos datos también podrían estar relacionados con algún cambio en la naturaleza de la bacteria por factores abióticos de repercusión global. ^{44, 51}

Por otro lado, se obtienen mayores recuentos de la bacteria en otro estudio (1993) realizado en Guadalajara durante un año por Torres y Fernandez en el que se analizaron 57 muestras de ostras, pescados y camarones obteniendo una prevalencia de *V. parahaemolyticus* del 45.6%, siendo 71.4% en pescados, 44% en ostras y 27.6% en camarones que se obtuvo un mayor número de positivos durante los meses más calidos. Éstos resultados exceden grandemente al porcentaje de *Vibrio parahaemolyticus* total de 14% obtenido en el presente estudio realizado en Lima Metropolitana y Callao probablemente porque el estudio de Guadalajara tuvo una duración mucho mayor y por lo tanto, la colección de muestras también fue mucho mayor incluyendo los meses de verano en los que el recuento de *Vibrio parahaemolyticus* también se ve favorecido. No obstante, los porcentajes hallados por especie en el estudio de Guadalajara guardan relación con los obtenidos en el presente trabajo de tesis tal como se observa en la tabla 3 donde los mayores porcentajes obtenidos de *Vibrio*

parahaemolyticus total (incluyendo al *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa positivo) estuvieron en las muestras de pescados (6%) y moluscos (6%) y menor en crustáceos (2%) mientras que Torres y Fernandez también obtuvieron mayores porcentajes en pescados (71.4%) y moluscos (44%) que en los crustáceos (27.6%) analizados. Un recuento mayor también es obtenido a partir de muestras colectadas durante los meses más calidos y durante todo más de un año tal como se observa en el estudio de Cook, Bowers y De Paola donde se analizaron 671 muestras de moluscos por un periodo de 12 a 16 meses (1999-2000) en 14 lugares de EE.UU. dentro de su marco nacional de vigilancia permanente de *Vibrio*. Cook *et al.* concluyeron que las densidades de *Vibrio parahaemolyticus* variaron de acuerdo a la temperatura del lugar donde se colectaron las muestras siendo mayor en aquellas provenientes de las costas del Golfo en dicho país. En sus resultados, los conteos de la bacteria excedieron las 1000 UFC/g en el 5% de las muestras. *Vibrio parahaemolyticus* patogénico (*tdh+*) fue detectado en el 6% de todas las muestras mediante conteo directo en placa y la prueba del gen. Además, 61.5% de todas las muestras positivas del conteo directo en placa estuvieron en el límite más bajo de detección (10 UFC/g). Una conclusión interesante que mencionan Cook *et al.* es que la frecuencia de detección de *Vibrio parahaemolyticus* patogénico estuvo significativamente relacionada con la temperatura del agua y con la densidad de *Vibrio parahaemolyticus* total. También señala que la falla para detectar *V. parahaemolyticus* patógeno en dichos moluscos fue atribuida a la baja presencia y a la distribución irregular del organismo.^{19, 64}

En cuanto a la patogenicidad, por un lado el porcentaje de 8% de muestras que presentaron un fenómeno Kanagawa positivo en éste estudio se contrasta con los resultados de Vilcapoma (1991) Kanagawa negativos para la totalidad de 364 muestras de moluscos y crustáceos frescos procedentes de Ica, Lima, Ancash y Piura. También cabe notar el estudio de Guevara que de 74 muestras se obtuvieron sólo 3 cepas Kanagawa positivas en cebiches de Lima. Éste 8% también se contrasta con el comentario de la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos de Norteamérica (FDA) sobre la obtención usual de cepas Kanagawa negativas cuando éstas son provenientes de productos marinos que guarda relación con estudios previos que reportan un recuento de 0 a 6% de *V. parahaemolyticus* patogénico. Por otro lado, según el análisis de De Paola *et al.* con respecto a la patogenicidad de *V. parahaemolyticus* ésta fue hallada en 34 (21.8%) de 156 muestras por conteo directo en placa y enriquecimiento a la vez y cuyos parámetros fueron temperatura y salinidad. Se menciona una aparente relación inversa entre la temperatura del agua y la prevalencia de cepas patogénicas. Más aún, al parecer la relación entre *Vibrio parahaemolyticus* patogénico con respecto a *Vibrio parahaemolyticus* total es estacional. De Paola *et al.* encontraron que las cepas patogénicas son más abundantes en invierno. Ésta mayor prevalencia de *Vibrio parahaemolyticus* patogénico en invierno no fue observada en estudios previos. En general, el organismo se multiplica durante las épocas más cálidas. Éste crecimiento disminuye o se detiene mientras el invierno se aproxima. Sin embargo como lo mencionan De Paola *et al.*, éste comportamiento no se halla explicado en la literatura

consultada que sugiera que la cepas *tdh*⁺ sean más tolerantes al frío que otras cepas de *Vibrio parahaemolyticus*.^{4, 24, 30, 35, 66}

Aunque el porcentaje obtenido de *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa positivo es alto en comparación con los estudios de Guevara y Vilcapoma, el recuento de éste organismo patógeno en especies marinas debería ser reconsiderado mediante estudios posteriores con volúmenes de muestra que sean mayores y abarquen un período y una geografía más amplios. Así mismo, un procedimiento seguido para aislar *V. parahaemolyticus tdh*⁺ mediante siembra de enriquecimiento previo sería más conveniente para especies marinas colectadas de los lugares de expendio al ver los resultados obtenidos en el estudio de De Paola *et al.* donde se obtiene una recuperación mucho más constante a lo largo de los meses de recolección del enriquecimiento que del conteo directo en placa.²⁴

Los valores obtenidos en la prueba de ureasa fueron casi totalmente negativos a excepción de una cepa (2% del total de 50 muestras), lo que contrasta con Honda que obtuvo un 5.7% de *Vibrio parahaemolyticus* ureasa-positivos a partir de 88 aislamientos de productos marinos congelados y tampoco se asemeja a sus resultados obtenidos de muestras de agua de mar donde no obtuvo cepas ureasa-positivo.³⁷

El resultado positivo de la prueba de ureasa, que en el presente estudio dio positivo sólo para una cepa aislada proveniente de una sola muestra (molusco), difiere de valores marcadamente más altos reportados por estudios en otras partes del mundo, entre ellos el de De Paola *et al.* cuyas cepas patogénicas produjeron ureasa y poseyeron el gen *trh* (gen de la hemolisina relacionado a la *tdh*). Algunos plantean la hipótesis sobre el hecho de que ésta positividad para ureasa junto con la presencia del gen

trh podrían incrementar la virulencia; sin embargo, el clon O3:K6, recientemente aislado, asociado a la expansión pandémica y las altas tasas de infección debidas a *Vibrio parahaemolyticus* no poseyó dichas cualidades. Adicionalmente, aproximadamente el 40% de cepas de éste microorganismo aisladas de humanos entre 1997 y 2001 no produjeron ureasa ni poseyeron *trh*.²⁴

A partir de la prueba de ureasa y de Kanagawa realizadas a las 50 muestras en el presente estudio en el año 2000, y en concordancia con Chowdhury *et al.*, se sugiere la presencia del gen *tdh* marcado por la hemólisis en agar Wagatsuma, mientras que el gen *trh* estaría correlacionado con un resultado positivo para ureasa que sólo se presentó en 1 de las muestras analizadas. Es de notar de acuerdo a la literatura que todas las cepas del nuevo clon pandémico de *Vibrio parahaemolyticus* (sin importar el serotipo o lugar de aislamiento) poseyeron el gen *tdh* mas no el gen *trh*.⁵⁰

El aporte de éste estudio estriba en la colección de información más reciente sobre la abundancia, distribución relativa, y características de *Vibrio parahaemolyticus* tanto patogénico como no patogénico de pescados, moluscos y crustáceos de consumo en Lima Metropolitana y Callao. Los datos y resultados obtenidos pueden servir de ayuda para futuras evaluaciones sobre la medida en que *V. parahaemolyticus* se encuentra presente en nuestras costas y cuál es su potencial riesgo para la salud humana.

V CONCLUSIONES

Se enumeró *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa positivo siendo hallado en 4 de las 50 muestras que representan un 8% del total de muestras analizadas, siendo los porcentajes hallados en pescados 2% (n=1), moluscos 4% (n=2) y crustáceos 2% (n=1).

El número más probable (NMP) de *V. parahaemolyticus* Kanagawa positivo que se obtuvo de éstas 4 muestra tuvo un valor mínimo de 3/g y uno máximo de 7,4/g en moluscos, mientras que se obtuvo un valor de 3/g en pescados y 3/g en crustáceos procedentes de terminales pesqueros, muelles y supermercados de consumo en Lima Metropolitana y Callao.

VI RECOMENDACIONES

- A. Se hace necesaria la realización de pruebas moleculares para la determinación de factores de virulencia de la bacteria aislada en éste estudio.
- B. Es necesario profundizar el impacto que tienen los factores abióticos tales como las condiciones climáticas del Perú o el calentamiento global; así como los de carácter intrínseco de ésta bacteria sobre su propio comportamiento.
- C. Se debe complementar el estudio de *Vibrio parahaemolyticus* Kanawaga positivo con el análisis epidemiológico de la bacteria en zonas de la Costa con mayor contaminación.
- D. Es aconsejable mantener un sistema que monitorice, a largo plazo y de manera rutinaria, la frecuencia y naturaleza de los brotes causados por *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa positivo en el Perú y proponer su divulgación de manera masiva por medio de organismos gubernamentales encargados de velar por la salud de los ciudadanos.

VII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ansaruzzaman M, Lucas M, Deen J L, Bhuiyan N A, Safa A, Sultana M, et al. Pandemic serovars (O3:K6 and O4:K68) of *Vibrio parahaemolyticus* associated with diarrhoea in Mozambique: Spread of the pandemic into the African continent. J Clin Microbiol 2005; 43(6):2559–62.
2. Arévalo H. Programas sobre Protección del Medio Ambiente Marino Peruano. Primer Seminario Virtual de las Ciencias del Mar. Lima: Instituto del Mar del Perú IMARPE; 2002.
3. Aurazo M. *Vibrio parahaemolyticus* y sus principales diferencias con *Vibrio cholerae*. Nota Técnica. Lima: Dept. Microbiología, Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente CEPIS; 1992.
4. Ayres PA, Barrow GI. The distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in British Coastal Waters: Report of a Collaborative Study 1975–6. J Hyg Camb 1978; 80(2): 281–94.
5. Balakrish G, Hormazábal J The *Vibrio parahaemolyticus* Pandemic. (Revista Chilena de Infectología) Rev Chil Infect 2005; 22(2):125–30.
6. Barbieri E, Faizano L, Fiorentini C, Pianetti A, Baffone W, Fabbri A et al. Occurrence, Diversity, and Pathogenicity of Halophilic *Vibrio* spp. And Non-O1 *Vibrio cholerae* from Estuarine Waters along the Italian Adriatic Coast. Appl Env Microbiol 1999; 65(6): 2748–53.
7. Bisharat N, Cohen D I, Harding R M, Falush D, Crook D W, Peto T, et al. Hybrid *Vibrio vulnificus*. Emerg Infec Dis 2005; 11: 30–5.
8. Bisharat N, Raz R. *Vibrio* infection in Israel due to changes in fish marketing. Lancet 1996; 348: 1585–6.

9. Bird E, Soegiarto A editors. The Oceanographic Features of the Coastal Region Between Jakarta and Cirebon, Biology. Proceedings of the Jakarta Workshop on Coastal Resources Management; 1979 Sept 11–15. Jakarta, Indonesia. United Nations University Press. Tokyo, 1980.
10. Bocanegra FA, Mercado PE, Saldaña WH. *Vibrio parahaemolyticus*, Presencia en Ambientes Hialinos y Mixohialinos de la Provincia de Trujillo, Perú. Rev Lat Amer Microbiol. 1981; 23:135–40.
11. Bravo L, Monte RJ, Gómez M, Pimentel T, Dumas S. Identificación de especies de microorganismos del Género *Vibrio*. Rev Cubana Med Trop 1991 Abril–Agosto; 43(2):107–10.
12. British Columbia Centre for Disease Control BCCDC. (Canada). Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* Related to Raw Oysters in British Columbia. Canada Communicable Disease Report 1997; 23(19): 145–8.
13. Cabrera QG. Investigación de *Vibrio parahaemolyticus* en moluscos. 1974.
14. Centers for Disease Control and Prevention. (US) CDC. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* associated with Eating Raw Oysters-Pacific Northwest, 1997. Morb Mortal Wkly Rep. 1998 Jun 12; 47(22); 457–62.
15. Centers for Disease Control and Prevention (US) CDC. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* Infection Associated with Eating Raw Oysters and Clams Harvested from Long Island Sound - Connecticut, New Jersey and New York, 1998. Morb. Mortal. Wkly. Rep. 1999; 48(03):48–51.
16. Centers for Disease Control and Prevention; División of Bacterial and Mycotic Diseases (US) . *Vibrio Parahaemolyticus*. Atlanta, 2000.

17. Chowdhury N R, Chakraborty S, Ramamurthy T, Nishibuchi M, Yamasaki S, Takeda Y, et al. (Investigación) Molecular Evidence of Clonal *Vibrio parahaemolyticus* Pandemic Strains, Emerging Infectious Diseases 2000; 6(6): 631–36.
18. Chowdhury N R, Stine O C, Morris J G, Nair G B. Assessment of evolution of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* by multilocus sequencing typing. J Clin Microbiol 2004; 42: 1280–2.
19. Cook DW, Bowers JC, DePaola A. Density of Total and Pathogenic (tdh+) *Vibrio parahaemolyticus* in Atlantic and Gulf Coast Molluscan Shellfish at Harvest. J Food Prot 2002; 65(12): 1873–80.
20. Cordano AM. Enfermedades Infecciosas Emergentes. Anales de la Universidad de Chile 2000; 6(11).
21. Cordova J L, Astorga J, Silva W, Riquelme C. Characterization by PCR of *Vibrio parahaemolyticus* isolates collected during the 1997-1998 Chilean outbreak. Biol Res 2002; 35: 433–40.
22. Daniels NA, MacKinnon L, Bishop R, Altekruse S, Ray B, Hammomnd RM et al. *Vibrio parahaemolyticus* Infections in the United States, 1973–1998. J Infect Dis 2000; 181(5):1661–6.
23. De La Fuente JR. La Salud en un México en Transición. Salud Pública Méx 2004; 46(2): 164–68.
24. De Paola A, Nordstrom J, Bowers J, Wells J, Cook D. Seasonal Abundance of Total and Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama Oysters. Appl Env Microb 2003; 69(3):1521–6.
25. Department of Health and Human Services (US) CDC. *Vibrio* Surveillance System. Summary Data 1997–1998. 1999.

26. Department of Health and Human Services (US) CDC. *Vibrio* Surveillance System, Summary Data 1999. 2000.
27. Elliot, E.L., Kaysner, C.A., Jackson, L., and Tamplin, M.L. 1998. *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, and other *Vibrio* spp. Ch. 9. In US. Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual, 8th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.
28. Euzéby JP. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: Folder Disponible en Internet. Int. J. Syst. Bacteriol., 1997. (List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. Última actualización completa Noviembre 03, 2006. URL: <http://www.bacterio.net>).
29. Food and Agriculture Organization (US) FAO. Manual of Quality Control. Rev 1. Microbiological Analysis. 1992.
30. Food and Drug Administration (US) FDA. Bacteriological Analytical Manual. 7 ed. Washington, 1992.
31. Food and Drug Administration (US) FDA. Bacteriological Analytical Manual. 8 ed. Washington, 2001.
32. Food and Drug Administration (US) FDA; Center for Food Safety and Applied Nutrition (US) CFSAN. Bad Bug Book. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. Rockville, 2001.
33. Fuenzalida L, Hernandez C, Toro J, Rioseco L, Romero J, Espejo R. *Vibrio parahaemolyticus* in Shellfish and Clinical Samples During Two Large Epidemics of Diarrhoea in Southern Chile. Environmental Microbiology 2006; 8(4): 675.

34. Garrity G, Winters M, Searles D. Taxonomic Outline of the Procaryotic Genera; Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2 ed. Nueva York: Bergey's Manual Trust; 2001. p.12.
35. Guevara JM, Roel S, Del Carpio E. *Vibrio parahaemolyticus* en Cebiches vendidos por ambulantes de Lima-Perú. Diagnóstico 1989; 24(1):24–6.
36. Hervio-Heath D, Colwell RR, Derrien A, Robert-Pillot A, Fournier JM, Pommepuy M. Occurrence of Pathogenic Vibrios in Coastal Areas of France. Journal of Applied Microbiology 2002; 92(6): 1123–35.
37. Honda S, Matsumoto S, Miwatani T, Honda T. A survey of Urease-Positive *Vibrio parahaemolyticus* Strains Isolated from Traveller's Diarrhea, Sea Water and Imported Frozen Sea Foods. Eur J Epidemiol 1992; 8(6):861–4.
38. Instituto Mexicano del Seguro Social. IMSS. Manual para la Vigilancia Epidemiológica del Cólera en México 2004, 2º Ed. : 1–25.
39. Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual (PE) INDECOPI. Nomenclatura y Clasificación Científica de los Peces Comúnmente Reconocidos en el Perú para Fines Comerciales. Norma Técnica Peruana. El Instituto; 1974, Nov.; Lima.
40. Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual (PE) INDECOPI. Nomenclatura y Clasificación Científica de los Mariscos Comúnmente Reconocidos en el Perú para Fines Comerciales. Norma Técnica Peruana. El Instituto; 1974, Nov.; Lima.
41. International Commission on Microbiological Specifications for Foods ICMSF. Microbiología de los Alimentos. Características de los Patógenos Microbianos. Ed. Acribia, Zaragoza, 1998; p. 499–510.

42. Jiménez A, Gutierrez L, López S, Tapia R. El Cólera en México; Situación Epidemiológica Presente. Gaceta Médica de México 1995 Vol 131(3):363–66.
43. Joseph SW, Colwell RR, Kaper JB *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic Vibrios. Crit Rev Microbiol 1982; 10(1):77–124.
44. Kagiko MM, Damiano WA, Kayihura MM. Characterisation of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from Fish in Kenya. East Afr Med J 2001; 78(3):124–7.
45. Koneman E, Allen S, Dowell V, Janda W, Sommers H, Winn W. Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas Color. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, 1992; p. 158–59.
46. Lozano-León A, Torres J, Osorio C, Martinez-Urtaza J. Identification of *tdh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* from and Outbreak Associated with Raw Oyster Consumption in Spain. Federation of European Microbiological Societies 2003; 226(6): 281–4.
47. Mairata S. La Costa Huele (Artículo Periodístico). Caretas. 2003 Feb 20; ed. 1760; Lima.
48. Malnati L. La Contaminación de las Aguas en el Perú; Rol del Ministerio de Salud en su Control. Simposio sobre Ambiente, Salud y Desarrollo en las Américas. México 1974 Jul 29–Ago 2.
49. Martinez-Urtaza J, Simental L, Velasco D, DePaola A, Ishibashi M, Nakaguchi Y et al. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe. [letter]. Emerg Infect Dis 2005; 11(8): 1319–20.
50. Matsumoto C, Okuda J, Ishibashi M, Iwanaga M, Garg P, Rammamurthy T, et al. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by

- arbitrarily primed PCR and toxRS sequence analysis. J Clin Microbiol 2000; 38: 578–85.
51. Miranda MV. Aislamiento e Identificación de *Vibrio parahaemolyticus* en pescado fresco (Tesis Bachiller). Lima: U. N. Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas; 1976.
 52. Nair G B, Faruque S M, Bhuiyan N A, Kamruzzaman M, Siddique A K, Sack D A. New variants of *Vibrio cholerae* biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. J Clin Microbiol 2002; 40: 3296–9.
 53. Okuda J, Ishibashi M, Hayakawa E, Nishino T, Takeda Y, Mukhopadhyay AK, et al. Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan. J Clin Microbiol 1997; 35: 3150–5.
 54. Organización Meteorológica Mundial. El Niño/La Niña Hoy. El Niño Hoy. Ginebra, 2006.
 55. Pal S C, Sircar B K, Nair G B, Deb B C. Epidemiology of bacterial diarrhoeal diseases in India with special reference to *Vibrio parahaemolyticus* infections. In: Bacterial Diarrhoeal Disease, Eds. Y. Takeda and T. Miwatani. KTK Scientific Publishers, Tokyo 1984; p. 65–73.
 56. Quevedo F, Gonzáles S. El Cólera en Latinoamérica. Revisiones en Salud Pub 1995; 4: 35–56.
 57. Quilici M-L, Robert-Pillot A, Picart J, Fournier J-M. Molecular evidence for the spread of the new O3:K6 pandemic clone of *Vibrio parahaemolyticus* in France. Emerg Infect Dis 2005; 11(7): 1148–49.

58. Red Nacional de Epidemiología, Ministerio de Salud Chile. Brote de Gastroenteritis por *Vibrio parahaemolyticus*. Chile, Enero–Abril 2005.
59. Red Nacional de Epidemiología, Ministerio de Salud Chile. Brote de Gastroenteritis por *Vibrio parahaemolyticus*. Chile, año 2006.
60. Rosas I, Cravioto, A, Ezcurra E, editores. Microbiología Ambiental. Instituto Nacional de Ecología (MX), Universidad Nacional Autónoma de México, 134 p., 2004 México
61. Salinas PJ. Cólera: Una Revisión Actualizada. Parte 1: Introducción, Historia, Definición, Diagnóstico. Revista de la Facultad de Medicina, Universidad de los Andes, Venezuela 1992, 1(4):167–72.
62. Sato MI, Monteiro CK, Stoppe NC, Sanchez PS. Shellfish and Marine Water Microbiological Quality. Env Tox and Water Quality; 1992 Feb; 7(1):95–105.
63. Thayib SH, Suhadi F. An attempt to isolate *Vibrio parahaemolyticus* from mud and sea products around Jakarta Bay area. Oseanologi di Indonesia 1974; 2:41–55.
64. Torres MR, Fernández E. Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in Raw Fish, Oysters, and Shrimp. Rev Latinoam Microbiol 1993; 35(3): 267–72.
65. Urdaci MC, Marchand M, Grimont PA. Species of the genus *Vibrio* associated with Marine Products from Arachon Bay. Ann Inst Pasteur Microbiol 1988; 139(3):351–62.
66. Vilcapoma A, Flores A, León J, Huamán L. Contaminación de Peces y Mariscos por Vibriones Halofílicos en el Litoral Peruano. U. N. Mayor de San Marcos, Lima, Perú en: Memorias de la Conferencia Reunión de Emergencia sobre el Cólera en el Pacífico Sudeste. Santiago, Chile, 1991 Mayo 7–9; J.J Escobar (Ed), CPPS, Santiago, Chile.

67. Wong H C, Liu S H, Wang T K, Lee C L, Chiou C S, Liu D P, et al. Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 from Asia. Appl Environ Microbiol 2000; 66: 3981–6.
68. Woodman R. El Niño 1997-1998: Situación Reciente y Futura. Instituto Geofísico del Perú. Lima, 1997.
69. World Health Organization WHO; Food and Agriculture Administration FAO. Consulta mixta FAO/OMS de expertos sobre la evaluación de riesgos asociados a los peligros microbiológicos en los alimentos: Identificación de peligros, evaluación de exposición y caracterización de peligros de *Campylobacter* spp. en pollos para asar y *Vibrio* spp. en mariscos. Informe de la Oficina central de la Organización Mundial de la Salud OMS, 2001 Jul 23–27; Ginebra, Suiza.

X ANEXOS

Tabla 6. Pruebas bioquímicas típicas de *Vibrio parahaemolyticus*

Muestra Nº	Cepa Nº	Pruebas generales				Pruebas especiales	
		OX	MOV	AGS	TSI	O/129	
						10 ug	150 ug
3	35	(+)	(+)	K/A	K/A	R	S
2	6	(+)	(+)	K/A	K/A	R	S
	40	(+)	(+)	K/A	K/A	R	S
1	55	(+)	(+)	K/A	K/A	R	S
	59	(+)	(+)	K/A	K/A	R	S
	60	(+)	(+)	K/A	K/A	R	S
	61	(+)	(+)	K/A	K/A	R	S
7	81	(+)	(-)	K/A	K/A	R	S
12	111	(+)	(+)	K/A	K/A	R	S
17	217	(+)	(+)	K/A	K/A	R	S
	219	(+)	(+)	K/A	K/A	R	S
28	353	(+)	(+)	K/A	K/A	R	S
P <i>V.p.</i>	16	(+)	(+)	K/A	K/A	R	S

B=bacilo/ C=coco K/A=Alcalino/Ácido

OX=oxidasa R=resistente

MOV= movilidad S=sensible

PVp=Patrón de *V.p.*

molyticus

specificas	
ONPG	GRAM
(-)	(-)B
(-)	(-)B
(-)	(-)B
(-)	(-)B, C.
(-)	(-)B
(-)	(-)B
(-)	(-)B
(-)	(-)B, C.
(-)	(-)B
(-)	(-)B
(-)	(-)B
(-)	(-)B
(-)	(-)B
(-)	(-)B

CLEIBA. UNMSM. 2000

ANEXO 1

Lugares de origen de las muestras

Terminal pesquero Villa Maria del Triunfo	Muestra N° 1: Choros Muestra N° 2: Mojarilla Muestra N° 3: Conchas Abanico Muestra N° 4: Mejillones Muestra N° 5: Langostinos Muestra N° 16: Cojinova Muestra N° 17: Conchas Negras Muestra N° 18: Percebes	Muestra N° 19: Cangrejos Muestra N° 20: Choros Muestra N° 21: Caracoles Muestra N° 22: Mejillones Muestra N° 23: Conchas Abanico Muestra N° 24: Almejas Muestra N° 25: Camarones
Muelle de pescadores Chorrillos	Muestra N° 6: Pintadilla Muestra N° 7: Mimí Muestra N° 8: Lorna	Muestra N° 9: Chita Muestra N° 10: Mojarilla
Terminal pesquero Ventanilla	Muestra N° 11: Choros Muestra N° 12: Cangrejos Muestra N° 13: Almejas	Muestra N° 14: Camarones Muestra N° 15: Conchitas
Muelle de pescadores del Callao	Muestra N° 26: Pintadilla Muestra N° 27: Pampanito Muestra N° 28: Sardina Muestra N° 29: Machete Muestra N° 30: Lorna Muestra N° 31: Caballa Muestra N° 32: Jurel	Muestra N° 33: Allanque o Cachema Muestra N° 34: Choros Muestra N° 35: Cangrejos Muestra N° 36: Mejillones Muestra N° 37: Almejas Muestra N° 38: Conchas Abanico
Supermercados de Lima	Muestra N° 39: Ostras Muestra N° 40: Palabritas Muestra N° 41: Ostras Muestra N° 42: Ostras Muestra N° 43: Ostras Muestra N° 44: Navajas	Muestra N° 45: Ostras Muestra N° 46: Ostras Muestra N° 47: Ostras Muestra N° 48: Ostras Muestra N° 49: Ostras Muestra N° 50: Ostras

ANEXO 2

Nombres científicos de especies analizadas ^{39, 40}

Pescados	
<i>Anisotromus scapularis</i> "chita"	<i>Trachurus simetricus</i> "jurel"
<i>Mentichirrus rostratus</i> "mimí"	<i>Brevoortia maculata chilcae</i> "machete"
<i>Peprilus medius</i> "pampanito"	<i>Chellodactylus variegatus</i> "pintadilla"
<i>Sardinops sagax</i> "sardina"	<i>Cynoscion analis</i> "allanque" o "cachema"
<i>Sciaena deliciosa</i> "lorna"	
<i>Scomber japonicus</i> "caballa"	
<i>Seriola violacea</i> "cojinova"	
<i>Stellifer minor</i> "mojarrilla"	
Moluscos	
<i>Aulacomya ater</i> "choro"	<i>Anadara tuberculosa</i> "concha negra"
<i>Mitella polymerus</i> "percebe"	<i>Argopecten purpuratus</i> "concha abanico"
<i>Thais chocolata</i> "caracol"	
<i>Crassostrea gigas</i> "ostra"	
<i>Donax peruviana</i> "palabrita"	
<i>Ensis ensis</i> "navaja"	
<i>Semele solida</i> "almeja"	
<i>Tagelus dombeii</i> "conchita"	
<i>Mediolus guyanensis</i> "mejillon"	
Crustáceos	
<i>Penaeus brevirostris</i> "langostinos"	
<i>Cancer porteri</i> "cangrejos"	
<i>Panaeus vannamei</i> "camarones"	

ANEXO 3

Medios de cultivo y reactivos ³⁰

M1.- Solucion salina fosfatada (SSF) ~ Phospate buffered saline (PBS)

- NaCl 7.650 g
- Na₂HPO₄ 0.724 g
- KH₂PO₄ 0.210 g
- Agua 1000 mL

pH = 7.4 (NaOH 1N)

M2.- Agua peptonada alcalina (APA) ~ alkaline peptone water (APW)

- Peptona 10 g
- NaCl 10 g
- Agua 1000 mL

pH = 8.4

M3.- Agar tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa (TCBS)

- Extracto de levadura 5 g
- Peptona 10 g
- Sacarosa 20 g
- Tiosulfato de sodio 75H₂O 10 g
- Citrato de Sodio 72 H₂O 10 g
- Colato de Sodio 3 g
- NaCl 10 g
- Citrato férrico 1g
- Azul de bromotimol 0.04 g
- Azul de Timol 0.04 g
- Agar 15 g
- Agua destilada 1000 mL

Preparar en matraces de un volumen al menos 3 veces mayor que el volumen requerido de medio. Agregar los ingredientes a agua destilada tibia y calentar hasta disolver. Llevar a ebullición y remover inmediatamente del calor. No se coloca en el Autoclave. Enfriar hasta 50° C y verter en placas Petri. Secar las placas así preparadas dejándolas toda la noche o a 37–45° C antes de su uso.

M4.- Agar gelatina (AG) ~ Gelatin agar (GA)

- Peptona 4 g
- Extracto de levadura 1 g
- Gelatina 15 g
- Agar 15 g
- Agua destilada 1000 mL

Disolver los ingredientes con agitación constante para prevenir la coagulación de la gelatina hasta llevar a ebullición para la disolución de la gelatina y del agar. Ajustar el pH a 7.2 ± 0.2 . Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121° C. Enfriar a $45\text{--}50^\circ$ C. Vaciar en placas.

M5.- Agar gelatina sal (GS) ~ Gelatin salt agar (GS)

Preparar el agar gelatina (descrito arriba), pero agregar 30 g NaCl/litro. Suspender los ingredientes y llevar a ebullición hasta disolver la gelatina y el agar. Ajustar a pH 7.2 ± 0.2 . Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121° C. Enfriar a $45\text{--}50^\circ$ C. Vaciar en placas. De ser necesario, usar 25 a 30 g agar/L a fin de inhibir el crecimiento de *Vibrio* spp. tal como *Vibrio alginolyticus*.

M6.- Agar tripticasa de soya (TSA) ~ Trypticase (tryptic) soy agar

- Peptona tripticasa 15 g
- Peptona fitona 5 g
- NaCl 5 g
- Agar 15 g
- Agua 1000 mL

Calentar con agitación para disolver el agar. Hervir durante 1 minuto. Dispensar en los tubos apropiados o en matraces. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121° C. El pH final es 7.3 ± 0.2 . Para uso con *Vibrio* spp halofílico, agregar NaCl a una concentración final de 3%.

M7.- Reactivo para citocromo oxidasa ~ Cytochrome oxidase reagent

- N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina.2HCl 1g
- H₂O destilada 100 mL

Es preferible usar éste reactivo al momento de la preparación. Sin embargo, el reactivo puede ser usado por más de 7 días si es guardado en una botella oscura de vidrio bajo refrigeración.

M8.- Medio para prueba de motilidad ~ Motility test medium

- Extracto de carne 3 g
- Peptona 3 g
- NaCl 5 g
- Agar 4 g
- Agua 1000 mL

Calentar con agitación y llevar a ebullición por 1 a 2 minutos hasta disolver el agar. Dispensar 8 mL en tubos 16 x 150 mm. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121^a C con un pH final de 7.4 ± 0.2

M9.- Medio inclinado de arginina-glucosa ~ Arginine glucosa slant (AGS)

- Peptona 5 g
- Extracto de levadura 3 g
- Triptona 10 g
- NaCl 20 g
- Glucosa 1 g
- L-arginina 5 g
- Citrato de amonio férrico 0.5 g
- Tiosulfato de sodio 0.3 g
- Púrpura de bromocresol 0.02 g
- Agar 13.5 g
- Agua 1000 mL

Suspender los ingredientes en agua destilada disolver hasta ebullición. Dispensar unos 5 mL en tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121^a C. Obtener un pH final de 6.8–7.0

M10.- Agar hierro triple azúcar ~ Triple sugar iron agar

Medio 1:

- Peptona 20 g
- NaCl 5 g
- Lactosa 10 g
- Sucrosa 10 g
- Glucosa 1 g
- $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g
- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.2 g

- Rojo de fenol 0.025 g
- Agar 13 g

Medio 2:

- Extracto de carne 3 g
- Extracto de levadura 3 g
- Peptona 15 g
- Peptona proteosa 5 g
- Glucosa 1 g
- Lactosa 10 g
- Sucrosa 10 g
- FeSO₄ 0.2 g
- NaCl 5 g
- Na₂S₂O₃ 0.3 g
- Rojo de fenol 0.024 g
- Agar 12 g
- Agua destilada 1000 mL

Estos dos medios son intercambiables para uso general. Suspender los ingredientes del Medio 1 en agua destilada, mezclar cuidadosamente, y calentar con agitación ocasional. Hervir durante cerca de 1 minuto para disolver los ingredientes. Llenar tubos de ensayo de 16 x 150 mm a 1/3 de su capacidad y tapar para mantener condiciones anaerobias. Colocar en autoclave el Medio 1 por 15 minutos a 118° C.

Preparar el Medio 2 de la misma forma que el Medio 1, excepto que la permanencia en autoclave es durante 15 minutos a 121° C. Antes que el medio solidifique, se inclinan los tubos para obtener un área inclinada de 4–5 cm y un fondo de 2–3 cm. El pH final es 7.3 ± 0.2 para el Medio 1 y 7.4 ± 0.2 para el Medio 2.

Para uso con *Vibrio* spp halofílico, se agrega NaCl para una concentración final de 3%.

M11.- Vibriostático O/129 (2,4 – diamino – 6,7 – diisofosfil pteridina)

- 2,4-diamino-6,7-diisopropil pteridina (O/129) o sal fosfato
- Agua destilada estéril
- Papel de filtro estériles en discos de 5–6 mm de diámetro
- Micropipeta, calibrada para 10 µl

Marcar los discos para diferenciar 10 µg de 150 µg. Esterilizar los discos de papel de filtro en placas de Petri de vidrio. Disolver el O/129 ó O/129-PO₄ (pues la sal fosfato se disuelve más fácilmente) en agua destilada estéril.

Para discos de 150 µg: Colocar 10 µL de 15 mL/mL O/129 ó 20.8 mg/mL O/129-PO₄ en cada disco.

Para discos de 10 µg: Hacer una dilución 1:15 de soluciones O/129 y colocar 10 µL/mL O/129 ó 1.4 mg/mL O/129-PO₄ en cada disco. Secar los discos y se los guardó desecados y protegidos de la luz en el refrigerador.

M12.- Reactivo para prueba de ONPG ~ ONPG reagent test

Solución fosfato monosódico, 1.0 M, pH=7.0:

- Na₂HPO₄.12H₂O 6.9 g
- Agua destilada 45 mL
- NaOH sol., 30%(p/v) 3 mL

Disolver Na₂HPO₄.H₂O en agua destilada. Adicionar la solución de NaOH al 30% y ajustar el pH a 7.0. Llevar a un volumen de 50 mL con agua destilada y guardar en refrigeración. (cerca de 4° C)

Para preparar el reactivo ONPG:

- O-Nitrofenil-β-D-galactopiranosido 0.0133 M
- ONPG 80 mg
- Agua destilada, a 50°C 15 mL
- Sol. de Na₂HPO₄, 1.0 M, pH=7.0 5 mL

Disolver ONPG en agua destilada a 37° C. Adicionar 1.0 M de solución de Na₂HPO₄. La solución podría bajar el calor. Guardar en refrigeración (cerca de 4° C). Antes del uso, calentar una porción adecuada (suficiente para el número de pruebas) de la solución de ONPG a 37° C.

M13.- Caldo tripticasa de soya (TSB) ~ Trypticase (tryptic) soy broth

- Peptona tripticasa 17 g
- Peptona fitona 3 g
- NaCl 5 g
- K₂HPO₄ 2.5 g
- Glucosa 2.5 g
- Agua 1000 mL

Calentar con agitación suave hasta disolver. Distribuir porciones de 225 mL en matraces Erlenmeyer de 500 mL. o en tubos para prueba bioquímicas.

Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121° C. El pH final es de 7.3 ± 0.2 . Para Caldo tripticasa de soya sin dextrosa, preparar como se explica arriba pero omitir los 2.5 g de dextrosa.

En el caso de uso en *Vibrio* spp. halofílicos, agregar NaCl hasta una concentración de 2–3 %. O si lo requiera la prueba, hasta una concentración final de 0%, 3%, 6%, 8% y 10% de NaCl

M14.- Caldo rojo de metilo y Voges Proskauer ~ MR-VP broth

Medio 1:

- Buffer de peptona-agua en polvo 7 g
- Glucosa 5 g
- K_2HPO_4 5 g
- Agua destilada 1000 mL

Medio 2:

- Pancreatica digest de caseina 3.5 g
- Peptica digest de tejido animal 3.5 g
- Dextrosa 5 g
- Fosfato de potasio 5 g
- Agua destilada 1000 mL

Disolver los ingredientes en agua con calor moderado si es necesario.

Dispensar 10 mL en tubos de ensayo de 16 x 150 mm y colocar en autoclave por 15 minutos a 118–121° C. El pH final es 6.9 ± 0.2 .

Medio 3:

- Peptona 5 g
- Glucosa 5 g
- Buffer fosfato 5 g
- Agua destilada 1000 mL

Disolver los ingredientes en agua. Dispensar 10 mL en tubos de ensayo de 16 x 150 mm y colocar en autoclave por 15 minutos a 121° C. El pH final es de 7.5 ± 0.2 . Para uso con *Vibrio* spp. halofílico, se agrega NaCl para una concentración final de 3%.

M15.- Caldo púrpura de bromocresol ~ Bromocresol purple broth

BASE:

- Peptona 10 g
- Extracto de carne 3 g

- NaCl 5 g
- Púrpura de bromocresol 0.04 g
- Agua destilada 1000 mL

Agregar 5 g de carbohidrato* por litro de base. Dispensar volúmenes de 2.5 mL en tubos de prueba de 13 x 100 mm conteniendo tubos invertidos de fermentación de 6 x 50 mm. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121° C. Llegar a un pH final de 7.0 ± 0.2 (*Preparar por separado baterías con sacarosa, lactosa, D-manitol, manosa, arabinosa y celobiosa esterilizados por filtración al vacío).

M16.- Medio semisolido OF Hugh y Leifson ~ OF Hugh Leifson semisolid medium

- Triptona 2 g
- NaCl 20 g
- KH₂PO₄ 0.3 g
- Azul de bromotimol 0.08 g
- Agar 2 g
- Glucosa* 10 g
- H₂O destilada 1000 mL

Calentar los ingredientes a ebullición para disolverlos. Dispensarlos en tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121° C. Ajustar a un pH de 6.8 (*Este medio también se prepara usando baterías con otros azúcares que reemplazan la glucosa de la fórmula. Preparar la fórmula sin incluir glucosa. Esterilizar de igual modo y enfriar a 45–50° C. A esta temperatura, agregar 100 mL de solución de azúcar al 10%. Dispensar 5 mL asépticamente en los tubos de prueba de 13 x 100 mm. Los azúcares fueron sacarosa, D-celobiosa, lactosa, arabinosa, D-manosa y D-manitol esterilizados por filtración al vacío).

M17.- Agar urea de Christensen

Base (1 g):

- Peptona 5 g
- NaCl 1 g
- Dextrosa 1 g
- KH₂PO₄ 2 g
- Rojo de Fenol (6 ml de solución 1:500) 0.012 g

- Agar 15 g
- Agua destilada 900 mL

Concentrado de urea:

- Urea 20 g
- Agua destilada 100 mL

Ajustar a un pH de 6.8 ± 0.1 . Esterilizar por filtración, disolver el agar en 900 mL de agua destilada, agregar los otros ingredientes, y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C . Enfriar a $50^\circ \pm 2^\circ \text{C}$. Luego agregar el concentrado de urea, mezclar y distribuir en tubos estériles de 16 x 125 mm. Inclinar para obtener un fondo y un área inclinada.

M18.- Agar Wagatsuma:

- Extracto de levadura 3 g
- Peptona 10 g
- NaCl 70 g
- K_2HPO_4 5 g
- Manitol 10 g
- Cristal violeta 0.001 g
- Agar 15 g
- Agua destilada 1000 mL
- Glóbulos Rojos de Sangre Humana o de Conejo Fresca (24 h) 50 mL

Mezclar la sangre humana o de conejo fresca (extraída dentro de 24 h) con igual volumen de solución salina fisiológica. Centrifugar las células a 4000 g aprox. y 4°C durante 10 minutos. Eliminar la solución salina y lavar del mismo modo dos veces más. Luego del 3er. lavado, resuspender las células en solución salina hasta volumen original. Paralelamente, suspender los demás ingredientes en agua destilada excepto la sangre tratada y hervir para disolver el agar. Ajustar a pH 8.0 ± 0.2 . Someter a vapor por 30 minutos sin colocar en autoclave. Enfriar a $45\text{--}50^\circ \text{C}$ y agregar 50 mL de glóbulos rojos lavados al medio enfriado. Mezclar y verter en placas de Petri estériles y secarlas completamente para usarlas inmediatamente. Puede prepararse menor cantidad del medio de ser necesario.

ANEXO 4

Categorías de riesgo ³

Clase de peligro	Condiciones normales en las que se supone será manipulado y consumido el alimento tras el muestreo		
	Grado de peligrosidad reducido	Sin cambio de peligrosidad	Aumenta la peligrosidad
Sin peligro directo para la salud. (contaminación general, vida útil y alteración)	Categoría 1	Categoría 2	Categoría 3
	3 clases	3 clases	3 clases
	n=5 c=3	n=5 c=2	n=5 c=1
Peligro para la salud bajo, indirecto	Categoría 4	Categoría 5	Categoría 6
	3 clases	3 clases	3 clases
	n=5 c=3	n=5 c=2	n=5 c=1
Moderado, directo, difusión limitada	Categoría 7	Categoría 8	Categoría 9
	3 clases	3 clases	3 clases
	n=5 c=2	n=5 c=1	n=5 c=1
Moderado, directo, difusión potencialmente extensa	Categoría 10	Categoría 11	Categoría 12
	2 clases	2 clases	2 clases
	n=5 c=0	n=10 c=0	n=20 c=0
Grave, directo	Categoría 13	Categoría 14	Categoría 15
	2 clases	2 clases	2 clases
	n=15 c=0	n=30 c=0	n=60 c=0

ANEXO 5

Determinación del número más probable ³⁰

Valores de NMP por gramo y los Intervalos de Confianza al 95% para 3 tubos c/u con 0.1, 0.01 y 0.001 g de inóculo											
Tubos Posit.			NMP/g	Lim.conf.		Tubos Posit			NMP/g	Lim. conf.	
0.10	0.01	0.001		Bajo	Alto	0.10	0.01	0.001		Bajo	Alto
0	0	0	<3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,1
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--

ANEXO 6

Asociación de *Vibrio* spp. con diferentes síndromes clínicos ³¹

Especies	Gastroenteritis	Infección de herida	Infección de oído	Septicemia primaria	Septicemia secundaria
<i>V. cholerae</i> O1	+++	+			
<i>V. cholerae</i> no-O1	+++	++	+	+	+
<i>V. mimicus</i>	++		+		
<i>V. fluvialis</i>	++				
<i>V. parahaemolyticus</i>	+++	+	+		+
<i>V. alginolyticus</i>	(+)	++	++	+	
<i>V. cincinnatiensis</i>			+		
<i>V. hollisae</i>	++			+	
<i>V. vulnificus</i>	+	++		++	++
<i>V. furnissii</i>	(+)				
<i>V. damsela</i>		++			
<i>V. metschnikovii</i>	(+)			(+)	
<i>V. carchariae</i>		+			

^a +++ = reportados frecuentemente, ++ = menos común (6-100 reportes); + = raro (1-5 reportes), y (+) = asociación no es clara.

^b Tabla tomada de A.T. Pavia *et al.* (BAM, 2001)

ANEXO 7

Límites microbianos recomendados ⁴¹

Producto	n ²	c ³	Bacteria/g o /cm ²	
			m ⁴	M ⁵
Pescado fresco y congelado y pescado ahumado frío	5	2	10 ²	10 ³
Crustáceos congelados crudos	5	1	10 ²	10 ³
Crustáceos congelados cocidos	5	1	10 ²	10 ³
Carne de cangrejo cocido, enfriado, y congelado	10	1	10 ²	10 ³
Moluscos bivalvos frescos y congelados	10	1	10 ²	10 ³

²Número de unidades de muestra representativas.

³Máximo número de unidades de muestra aceptables con conteo bacteriano entre m y M.

⁴Máximo conteo bacteriano recomendado para productos de buena calidad.

⁵ Máximo conteo bacteriano recomendado para productos de calidad marginalmente aceptable.

Conteos en placa por debajo de "m" son considerados de Buena calidad. Conteos en placa entre "m" y "M" son considerados de calidad marginalmente aceptable, pero pueden ser aceptados si el número de muestras no excede "c." Conteos en placa iguales o mayores a "M" son considerados como de calidad inaceptable (ICMSF, 1986).

ANEXO 8

Detalle de crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* en GA/GS y en TSA con sal

Muestra	Cepa	TSA+3%NaCl	GA	GS
3	35	(+)escaso	(-)	(+)
2	6	(+)	(+)escaso	(+)
	40	(+)	(-)	(+)
1	55	(+)	(-)	(+)
	59	(+)	(-)	(+)
	60	(+)	(-)	(+)
	61	(+)	(-)	(+)
7	81	(+)	(-)	(+)
12	111	(+)	(+)escaso	(+)
17	217	(+)	(-)	(+)
	219	(+)	(-)	(+)
28	353	(+)	(-)	(+)

CLEIBA. UNMSM. 2000

GA=Agar gelatina

GS=Agar gelatina sal

Detalle de pruebas típicas generales y específicas de *Vibrio parahaemolyticus*

Muestra Nº	Cepa	OX	MOV	AGS	TSI	O/129		ONPG	GRAM
						10 ug	150 ug		
3	35	(+)	(+)	K/A	K/A	R	S	(-)	(-)B
2	6	(+)	(+)	K/A	K/A	R	S	(-)	(-)B
	40	(+)	(+)	K/A	K/A	R	S	(-)	(-)B
1	55	(+)	(+)	K/A	K/A	R	S	(-)	(-)B, C.
	59	(+)	(+)	K/A	K/A	R	S	(-)	(-)B
	60	(+)	(+)	K/A	K/A	R	S	(-)	(-)B
	61	(+)	(+)	K/A	K/A	R	S	(-)	(-)B
7	81	(+)	(-)	K/A	K/A	R	S	(-)	(-)B, C.
12	111	(+)	(+)	K/A	K/A	R	S	(-)	(-)B
17	217	(+)	(+)	K/A	K/A	R	S	(-)	(-)B
	219	(+)	(+)	K/A	K/A	R	S	(-)	(-)B
28	353	(+)	(+)	K/A	K/A	R	S	(-)	(-)B
Patrón <i>V.p.</i>	16	(+)	(+)	K/A	K/A	R	S	(-)	(-)B

CLEIBA. UNMSM. 2000

B=bacilo/ C=coco

K/A=Alcalino/Ácido

OX=oxidasa

R=resistente

MOV= movilidad

S=sensible

Detalle de pruebas complementarias de *Vibrio parahaemolyticus*

Muestra N°	Cepa N°	Crec en caldo triptonado					Crec* 42 C°	VP	Urea
		0%	3%	6%	8%	10%			
3	35	(+)	(++)	(+++)	(+)	(+)d	(+)	(-)	(-)
2	6	(+)	(++)	(+)	(+)	(+)d	(+)	(-)	(-)
	40	(+)	(++)	(+)	(+)	(+)d	(+)	(-)	(-)
1	55	(+)	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(-)	(-)
	59	(+)	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(-)	(-)
	60	(+)	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(-)	(-)
	61	(+)	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(-)	(+)
7	81	(+)	(++)	(+)	(+)	(+)d	(+)	(-)	(-)
12	111	(+)	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(-)	(-)
17	217	(+)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
	219	(+)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
28	353	(+)	(++)	(+)	(++)	(+)d	(+)	(-)	(-)
PVp	16	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)d	(+)	(-)	(-)

CLEIBA. UNMSM. 2000

%=concentración de NaCl

Crec=crecimiento

(+,...,+++)=intensid crec

d= débil

VP=Pba Voges-Proskauer

Urea=Hidrólisis de Urea

PVp=Patrón *Vibrio parahaemolyticus*

Detalle de prueba complementaria de Hugh Leifson para *V. parahaemolyticus* en Medio OF

Muestra	Cepa	Oxidación						Fermentación					
		D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
3	35	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
2	6	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	40	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
1	55	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	59	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	60	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	61	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
7	81	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
12	111	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
17	217	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	219	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
28	353	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
PVp	16	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

CLEIBA. UNMSM. 2000

D1,D2,D3,D4,D5,D6 =Nro. de días

PVp= Patrón *V.p.*

Detalle de prueba complementaria de fermentación de azúcares de *Vibrio parahaemolyticus* (I)

Muestra	Cepa	Fermentación a 4 Días											
		Sacarosa				Celobiosa				Lactosa			
		D1	D2	D3	D4	D1	D2	D3	D4	D1	D2	D3	D4
3	35	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+/-)	(-)	(-)	(-)
2	6	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+/-)	(-)	(-)	(-)
	40	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+/-)	(-)	(-)	(-)
1	55	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+/-)	(-)	(-)	(-)
	59	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+/-)	(-)	(-)	(-)
	60	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+/-)	(-)	(-)	(-)
	61	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+/-)	(-)	(-)	(-)
7	81	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+/-)	(-)	(-)	(-)
12	111	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+/-)	(-)	(-)	(-)
17	217	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+/-)	(-)	(-)	(-)
	219	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
28	353	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+/-)	(-)	(-)	(-)
PVp	16	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+/-)	(-)	(-)	(-)

PVp=Patrón de *V.p.*

CLEIBA. UNMSM. 2000

D1,D2,D3,D4 = Nro. de días

Detalle de prueba complementaria de fermentación de azúcares de *Vibrio parahaemolyticus* (II)

Muestra	Cepa	Fermentación a 4 Días											
		Arabinosa				D-Manosa				D-Manitol			
		D1	D2	D3	D4	D1	D2	D3	D4	D1	D2	D3	D4
3	35	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)
2	6	(+)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)
	40	(+)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+)	(+)	(+)
1	55	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)
	59	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)
	60	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)
	61	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)
7	81	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)
12	111	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)
17	217	(+)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+)	(+)	(+)	(+)
	219	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+)	(+)	(+)	(+)
28	353	(+)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)
PVp	16	(+)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)

PVp=Patrón de *V.p.*

CLEIBA. UNMSM. 2000

D1,D2,D3,D4 = Nro. de días
